

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑲ Numéro de dépôt: 80401425.6

⑤① Int. Cl.³: **C 08 B 37/10, A 61 K 31/725**

⑳ Date de dépôt: 06.10.80

③① Priorité: 05.10.79 GB 7934673
 07.01.80 GB 8000443
 02.07.80 GB 8021749
 02.07.80 GB 8021750
 15.09.80 GB 8029697

⑦① Demandeur: **CHOAY S.A.**, 48, Avenue Théophile-Gautier, F-75782 Paris Cédex 16 (FR)

⑦② Inventeur: Lormeau, Jean-Claude, 23-27 Plein Sud, F-76150 Maromme La Main (FR)
 Inventeur: Choay, Jean, 130, Faubourg Saint-Honoré, F-75008 Paris (FR)
 Inventeur: Petitou, Maurice, Appt. 201 27, rue du Javelot, F-75645 Paris Cedex 13 (FR)

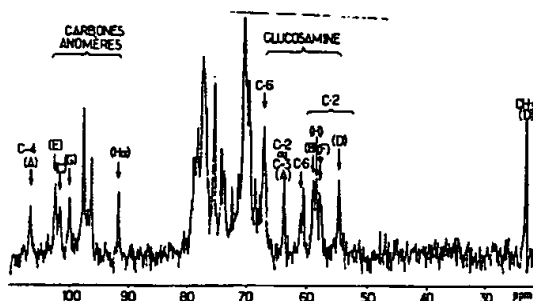
④③ Date de publication de la demande: 15.04.81
Bulletin 81/15

④④ Etats contractants désignés: AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑦④ Mandataire: **Peaucelle, Chantal et al, Cabinet Plasseraud** 84, rue d'Amsterdam, F-75009 Paris (FR)

⑤④ Fractions oligosaccharidiques et oligosaccharides possédant des propriétés biologiques, leurs procédés de préparation et leurs applications en tant que médicaments.

⑤⑦ Oligosaccharides pouvant être obtenus à partir d'héparine comportant des constituants hépariniques de poids moléculaire de 2000 à 50 000. Ces oligosaccharides possèdent une affinité élevée pour l'AT III et un titre Yin-Wessler élevé. Le rapport de leur titre Yin-Wessler à leur titre USP est d'au moins 30. Ils sont constitués de chaînes saccharidiques ne renfermant pas plus de huit motifs saccharadiques. Ils possèdent un signal caractéristique dans la région C-2 de résidu N-sulfate-glucosamine. Ils sont doués d'activité antithrombotique et sont donc utilisables comme médicaments antithrombotiques.



EP 0 027 089 A1

Fractions oligosaccharidiques et oligosaccharides possédant des propriétés biologiques, leurs procédés de préparation et leurs applications en tant que médicaments.

L'invention est relative à des fractions oligosaccharidiques et à des oligosaccharides possédant des propriétés biologiques leur permettant notamment de contrôler, de manière spécifique, certaines étapes
5 de la coagulation sanguine.

Elle concerne également leurs procédés d'obtention et leurs applications en tant que principes actifs de médicaments.

L'invention est plus particulièrement relative
10 à des oligosaccharides (et aux fractions oligosaccharidiques qui les contiennent) possédant une activité hautement sélective vis-à-vis du facteur X activé ou facteur Xa du sang, à savoir une activité antithrombotique puissante, sans entraîner de risques
15 hémorragiques pour le patient. Le terme "fraction oligosaccharidique" est utilisé dans la description et les revendications pour désigner un mélange relativement homogène de fragments ou chaînes d'oligosaccharides constitués par un nombre variable de
20 motifs saccharidiques.

Les travaux effectués par les inventeurs dans ce domaine les ont amenés à considérer les fractions oligosaccharidiques biologiquement actives, et les oligosaccharides eux-mêmes, tels qu'obtenus à partir
25 de l'héparine.

On notera que le terme héparine est utilisé dans la description et les revendications dans son sens le plus large, pour désigner indifféremment une préparation d'héparine commerciale de qualité pharmaceutique ou une héparine brute telle qu'obtenue par
30 extraction à partir de matériaux biologiques, en particulier de tissus de mammifères.

Il est admis que l'héparine est un polysaccharide hétérogène aussi bien au regard de la composition

des chaînes oligosaccharidiques qu'elle comporte que du poids moléculaire de ces chaînes.

Il est également considéré qu'elle renferme principalement des motifs d'acide 2 - O sulfate -
5 L - iduronique et de N-sulfate - D-glucosamine (6-O-sulfatée ou non) et, dans une moindre mesure, des motifs d'acide D-glucuronique, d'acide L-iduronique et de N-acétyl-D-glucosamine (6-O-sulfatée ou non).

On sait, en outre que l'héparine exerce son activité
10 anticoagulante en potentialisant l'effet inhibiteur de l'antithrombine III (AT III), qui est une protéine du plasma, vis-à-vis des cascades de réactions enzymatiques mises en jeu au cours de la coagulation.

Etant donné que l'héparine est capable de déprimer
15 simultanément un grand nombre de facteurs de la coagulation intervenant dans la création et le maintien des différentes formes d'hypercoagulabilité, son activité n'apparaît pas spécifique mais globale.

Si cette activité anticoagulante s'avère précieuse,
20 elle rend toutefois délicat le rééquilibrage du système coagulation-fibrinolyse chez les patients en traitement et ce, en raison du caractère global de son action. Il s'ensuit que l'administration (dans le but de prévenir les risques d'hypercoagulation, par exemple l'apparition
25 de thromboses postchirurgicales), de doses trop élevées de médicament anticoagulant, ou l'insuffisante sélectivité de ce médicament, peut finalement être à l'origine d'hémorragies graves.

L'étude approfondie de conditions variées de dé-
30 polymérisation de l'héparine et des mélanges de dépolymérisation résultants a amené les inventeurs à constater qu'il est possible, en opérant dans certaines conditions, d'obtenir des mélanges renfermant des oligosaccharides possédant de précieuses propriétés anti-
35 thrombotiques. Ces oligosaccharides sont plus satisfaisant que l'héparine en ce qui concerne la spécificité de leur activité. Ils sont plus particuliè-

rement capables d'augmenter l'activité spécifique de l'AT III vis-à-vis d'un nombre plus réduit de facteurs de la coagulation, plus spécialement vis-à-vis du facteur Xa du sang. Plus spécialement, les inventeurs ont
5 constaté que de telles fractions et oligosaccharides possèdent une faible activité anticoagulante globale telle que, mesurée selon la méthode USP. En conséquence, il apparaît que le rapport de leur activité anti-Xa, exprimée en unités Yin-Wessler et de leur
10 titre USP est élevé; il est en effet au moins égal à 30.

On rappelle que l'activité Yin-Wessler est plus spécialement représentative de l'aptitude des fractions actives à potentialiser l'inhibition du facteur Xa du sang par l'AT III dans le test correspondant
15 et le titre USP du pouvoir des fractions actives à inhiber la coagulation totale du sang ou du plasma.

Le titre Yin-Wessler est mesuré selon la méthode décrite par ces auteurs dans J. Lab. Clin. Med . . 1976, -81, 298 à 300 et le titre U.S.P. selon la
20 méthode décrite dans "Pharmacopea of the United States of America", pages 229 et 230 (voir également le deuxième supplément U.S.P.-NF, page 62 et le quatrième supplément U.S.P., page 90, intitulé respectivement "Drug substances" et "Dosage Forms").

25 D'une manière inattendue, il est ainsi apparu que cette activité spécifique anti-Xa souhaitée se retrouvait dans les chaînes oligosaccharidiques courtes, à savoir celles ne renfermant pas plus de 8 motifs, pouvant être isolées des mélanges de dépolymérisation en ayant recours à certaines opérations
30 de purification réalisées dans des conditions déterminées.

On notera que le terme "motif saccharidique" tel qu'utilisé dans la description et les revendications désigne les monosaccharides contenus dans les
35 chaînes de l'héparine.

En outre, selon un aspect de grand intérêt,

l'étude de ces fractions et oligosaccharides par les inventeurs a montré que cette activité anti-Xa, telle que mesurée par le test Yin-Wessler, était significative d'une activité antithrombotique *in vivo*.

5 L'invention vise donc à fournir de nouveaux oligosaccharides et les fractions qui les renferment, possédant une activité anti-Xa élevée et présentant à l'égard du facteur Xa une sélectivité remarquable dans le cadre des réactions enzymatiques successives
10 qui caractérisent le processus de coagulation.

Elle vise également à fournir des caractéristiques de structure de ces oligosaccharides.

Elle a également pour but de fournir un procédé d'obtention de ces fractions, de mise en oeuvre aisée.

15 L'invention a, en outre, pour but, de fournir des principes actifs de médicaments, et les médicaments eux-mêmes, capables notamment d'inhiber le facteur Xa selon un degré de sélectivité élevé alors que leur activité sur la coagulation globale peut être maintenue
20 à un niveau très faible. Ces médicaments sont avantageusement utilisables pour des traitements antithrombotiques sans entraîner de risques hémorragiques.

Les fractions évoquées ci-dessus sont du type de celles pouvant être obtenues par un procédé qui comprend
25 les étapes de :

- mise en contact de l'héparine (ou de fractions hépariniques) possédant une activité anticoagulante et ayant des chaînes de poids moléculaire d'environ 2.000 à environ 50000, avec un agent capable de
30 dépolymériser ou de fragmenter les chaînes hépariniques, les conditions utilisées pour réaliser cette étape étant ajustées de manière à obtenir un mélange de dépolymérisation contenant des fragments ou chaînes oligosaccharidiques constitués par 8 motifs
35 au plus, mais possédant cependant une activité anti-Xa (Yin-Wessler), et comprenant une séquence constituée de moins de 8 motifs, cette séquence

étant responsable dans une large mesure de l'activité spécifique anti-Xa des produits ;

- le traitement du mélange de dépolymérisation pour séparer au moins la majeure partie des chaînes oligosaccharidiques définies ci-dessus, ce traitement comprenant
5 avantageusement, a) le contact du mélange de dépolymérisation avec de l'AT III pour séparer sélectivement au moins la majeure partie, avantageusement pratiquement la totalité des oligosaccharides possédant une
10 séquence ayant une structure spécifique, nécessaire pour reconnaître l'AT III et se lier à cette dernière
 b) l'élimination des produits non désirés ;
 c) la récupération des produits désirés.

Lesdits oligosaccharides peuvent être caractérisés
15 par le fait qu'ils possèdent une structure spécifique capable de se lier à l'AT III. Ils possèdent une activité anti-Xa supérieure à celle de l'héparine et une activité anticoagulante globale très faible.

Les produits possédant une affinité pour l'AT III,
20 tels que récupérés à partir du procédé défini ci-dessus, sont soumis à une ou plusieurs étapes afin de séparer sélectivement les oligosaccharides à chaînes courtes définis ci-dessus.

Cette séparation est avantageusement obtenue par
25 fractionnement du mélange des produits élués possédant une affinité pour l'AT III, selon leur poids moléculaire et/ou leur densité ionique, puis par récupération des fractions désirées.

En variante, on peut réaliser le fractionnement
30 directement sur le mélange de dépolymérisation. A ce stade, les fractions comprenant des chaînes oligosaccharidiques courtes, avantageusement les oligosaccharides per se, peuvent être isolés. Les fractions, le cas échéant les oligosaccharides, possédant une
35 affinité élevée pour l'AT III, sont ensuite séparées en ayant recours à une étape comprenant la mise en contact de ces fractions avec de l'AT III comme indiqué ci-dessus.

Les fractions oligosaccharidiques de l'invention sont du type de celles obtenues en ayant recours aux différentes étapes définies ci-dessus. Elles sont caractérisées par le fait qu'elles sont dépourvues d'oligosaccharides comprenant plus de 8 motifs saccharidiques et qu'elles sont constituées par des oligosaccharides ne renfermant pas plus de 8 motifs saccharidiques, contenant une séquence comportant moins de 8 motifs saccharidiques, responsable, au moins, dans une large mesure, de leur activité anti-Xa.

Selon un mode de réalisation, les fractions de l'invention sont du type de celles pouvant être obtenues par un procédé dans lequel le matériau héparinique est dépolymérisé par un procédé chimique, en particulier de l'acide nitreux HNO_2 en milieu aqueux.

Les chaînes hépariniques sont alors coupées entre un motif N-sulfate glucosamine et le motif acide uronique suivant, ce qui entraîne la formation de chaînes contenant un groupe 2,5-anhydromannose à leur extrémité réductrice.

Dans un autre mode de réalisation, la dépolymérisation est réalisée par voie enzymatique, avantageusement avec une héparinase hautement purifiée, plus particulièrement une héparinase d'origine bactérienne.

Cette enzyme provoque la coupure des chaînes hépariniques entre le carbone anomère d'un résidu N-sulfate-glucosamine et le motif acide uronique suivant.

Son action produit un mélange d'oligosaccharides, (di-, tetra-, hexa-, octasaccharides) ayant essentiellement un nombre pair de motifs saccharidiques et terminés à leur extrémité non réductrice par un acide uronique α, β -insaturé.

On réalise avantageusement la dépolymérisation avec l'héparine purifiée dans des conditions permettant d'obtenir lesdits oligosaccharides biologiquement actifs, renfermant pas plus de 8 motifs saccharidiques et, pour certains d'entre eux, pas plus de 6 ou même moins.

Ces conditions sont telles que l'on atteigne

la limite de la réaction enzymatique. En d'autres termes, les oligosaccharides résultants ne sont plus sensibles à l'action de l'héparinase hautement purifiée.

Les oligosaccharides biologiquement actifs corres-
5 pondent alors à ceux qui peuvent être séparés desdits mélanges de dépolymérisation (obtenus par voie chimique ou enzymatique), par adsorption sur de l'AT III fixée sur un support par exemple de l'AT III fixée sur de l'agarose, dans des conditions permettant la fixation
10 des produits ayant une affinité pour l'AT III, tandis que ceux qui sont dépourvus d'une telle affinité sont éliminés, par exemple par lavage.

A la suite de cette opération, on procède à l'élution des produits retenus ou adsorbés afin de les
15 récupérer et à leur fractionnement pour isoler les chaînes courtes ayant une activité anti-Xa.

Le cas échéant, avant cette séparation basée sur l'affinité des fractions pour l'AT III, on soumet le mélange de dépolymérisation à un fractionnement
20 comme déjà mentionné, afin de séparer les chaînes désirées. On effectue avantageusement une telle séparation par gel perméation (gel filtration).

La plupart des chaînes oligosaccharidiques telles que celles isolées ci-dessus, outre leur
25 affinité élevée pour l'AT III, et par suite leur activité anti-Xa, sont caractérisées par des spectres RMN comprenant, entre autres, un signal caractéristique dans la région du carbone anomère en position 2 des résidus N-sulfate-glucosamine (ce signal étant repéré
30 par un astérisque sur les fig. 5 et 6). Ce signal n'apparaît pas avec l'héparine. Il peut être vraisemblablement attribué à la présence d'un substituant sur l'atome d'oxygène en position 3, et plus particulièrement à un groupe 3-O-sulfate, sur le résidu N-sulfate-D-glucosamine.
35

Ces oligosaccharides sont, en outre, caractérisés par un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont dans un rapport respectivement d'au moins 30, de

préférence d'au moins 100.

Des fractions oligosaccharidiques préférées et des oligosaccharides comprennent ceux ayant une affinité pour l'AT III et une activité anti-Xa (Yin-Wessler) supérieure à celle de l'héparine. Une telle activité peut être 10 fois supérieure à celle de l'héparine.

Des activités supérieures à 100 ui/mg peuvent être observées pour certains oligosaccharides. Des valeurs supérieures à 700 ui/mg, ou encore d'au moins 1000 ui/mg, même 1200, pouvant atteindre 2000 ui/mg ou plus ont été observées pour d'autres oligosaccharides.

Des oligosaccharides actifs de l'invention possèdent un résidu N-sulfate-D-glucosamine avantageusement 3-O-sulfaté (désigné par F dans la formule donnée ci-après).

D'autres oligosaccharides comprennent, en outre, un résidu N-acétyl-D-glucosamine (D) et/ou un résidu d'acide D-glucuronique (E) et/ou un résidu d'acide 2-O-sulfate-L-iduronique (G) et/ou un résidu de N-sulfate-D-glucosamine (H).

Chez d'autres oligosaccharides, on observe la présence des motifs saccharidiques suivants, à savoir d'acide 2-O-sulfate, 4,5-insaturé uronique (A) et/ou de N-sulfate-D-glucosamine (B) et/ou d'acide L-iduronique (C).

Des oligosaccharides préférés de l'invention possèdent un résidu N-sulfate-D-glucosamine à leur extrémité réductrice. Ce résidu est sulfaté ou non en position 3 et/ou 6.

Certains oligosaccharides contiennent tous les résidus indiqués ci-dessus.

Le dosage par colorimétrie des motifs N-acétyl-glucosamine, selon la méthode de Smith et Gilkerson dans Annal. Biochem. 1979, 98, p. 478-480, montre alors la présence d'environ une molécule de N-acétyl-glucosamine par chaîne oligosaccharidique.

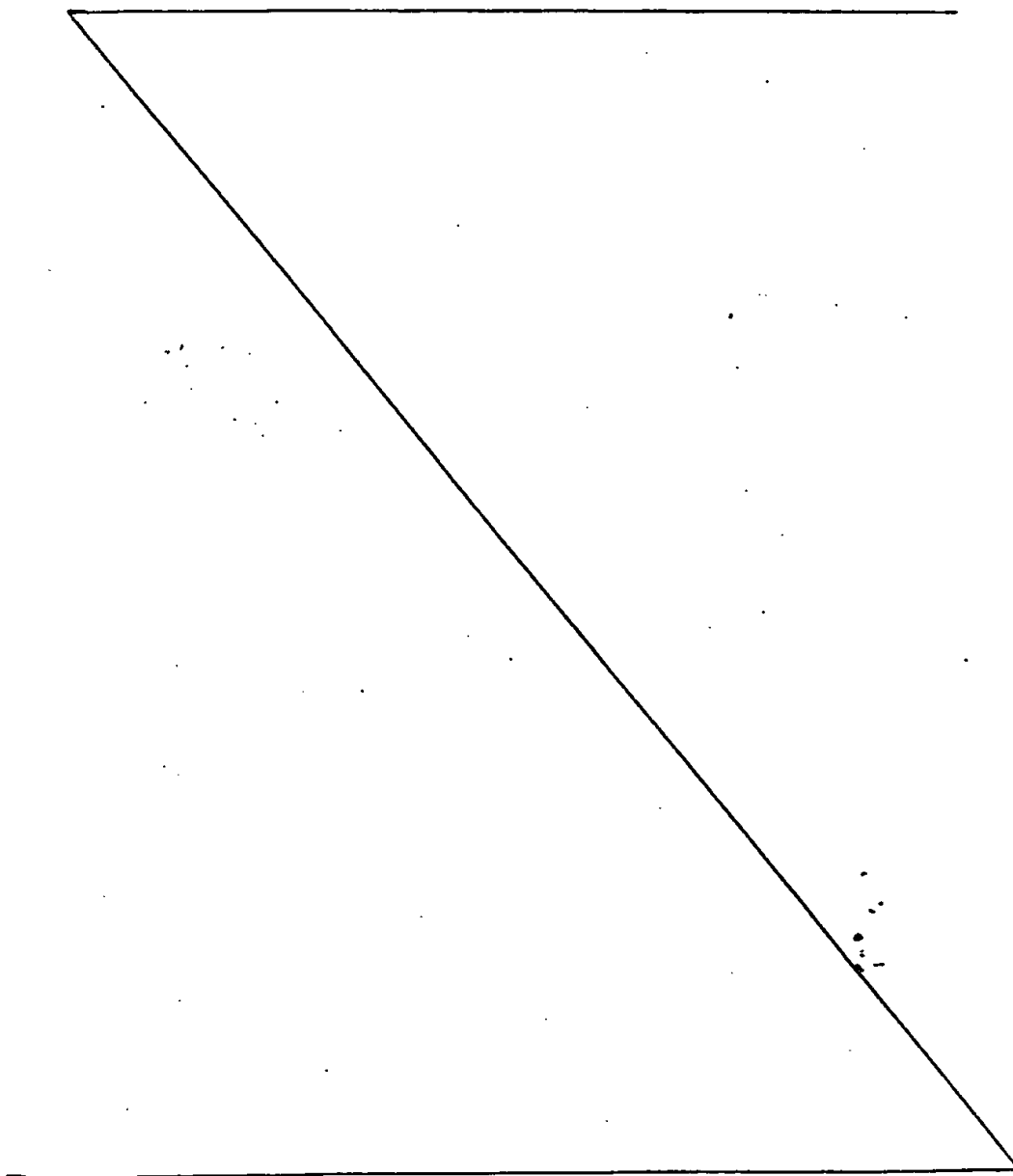
Le dosage de glucosamine avant et après hydrolyse acide permet la détermination des quantités respectives

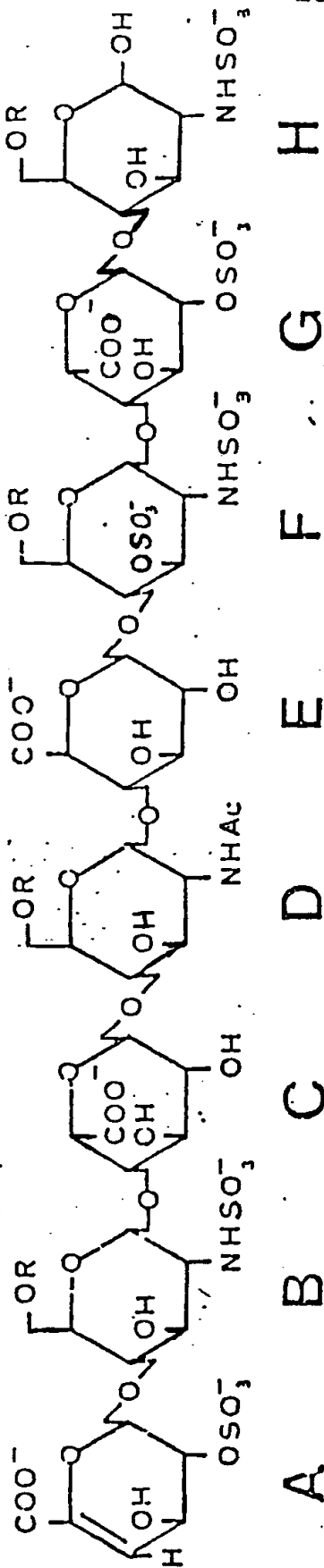
des motifs N-sulfate-glucosamine et N-acétyl-glucosamine.

Certains oligosaccharides de l'invention apparaissent ainsi caractérisés par la présence d'un motif N-acétyl-D-glucosamine pour deux motifs N-sulfate-glucosamine.

5 D'autres oligosaccharides sont caractérisés par la présence d'un motif N-acétyl-D-glucosamine pour trois motifs N-sulfate-D-glucosamine.

Un oligosaccharide de ce type est constitué par un octasaccharide correspondant à celui présentant la
10 séquence suivante ABCDEFGH.





0027089

Dans cette formule, R représente un atome d'hydrogène ou un groupe sulfate SO_3^- .

Un autre octasaccharide possède la séquence ABGHCDEF.

- 5 Des hexasaccharides actifs de l'invention comprennent également des motifs parmi lesdits motifs A,B,C,E et H. L'un de ces hexasaccharides possède la séquence ABCDEF.

- Un autre hexasaccharide possède la séquence
10 CDEFGH où C est un acide uronique insaturé.

Encore un autre hexasaccharide possède la séquence CDEFGH (où C est un résidu d'acide iduronique).

- D'autres oligosaccharides actifs sont des pentasaccharides, en particulier celui possédant la structure
15 DEFGH.

Des chaînes oligosaccharidiques plus courtes, encore biologiquement actives, font également partie de l'invention.

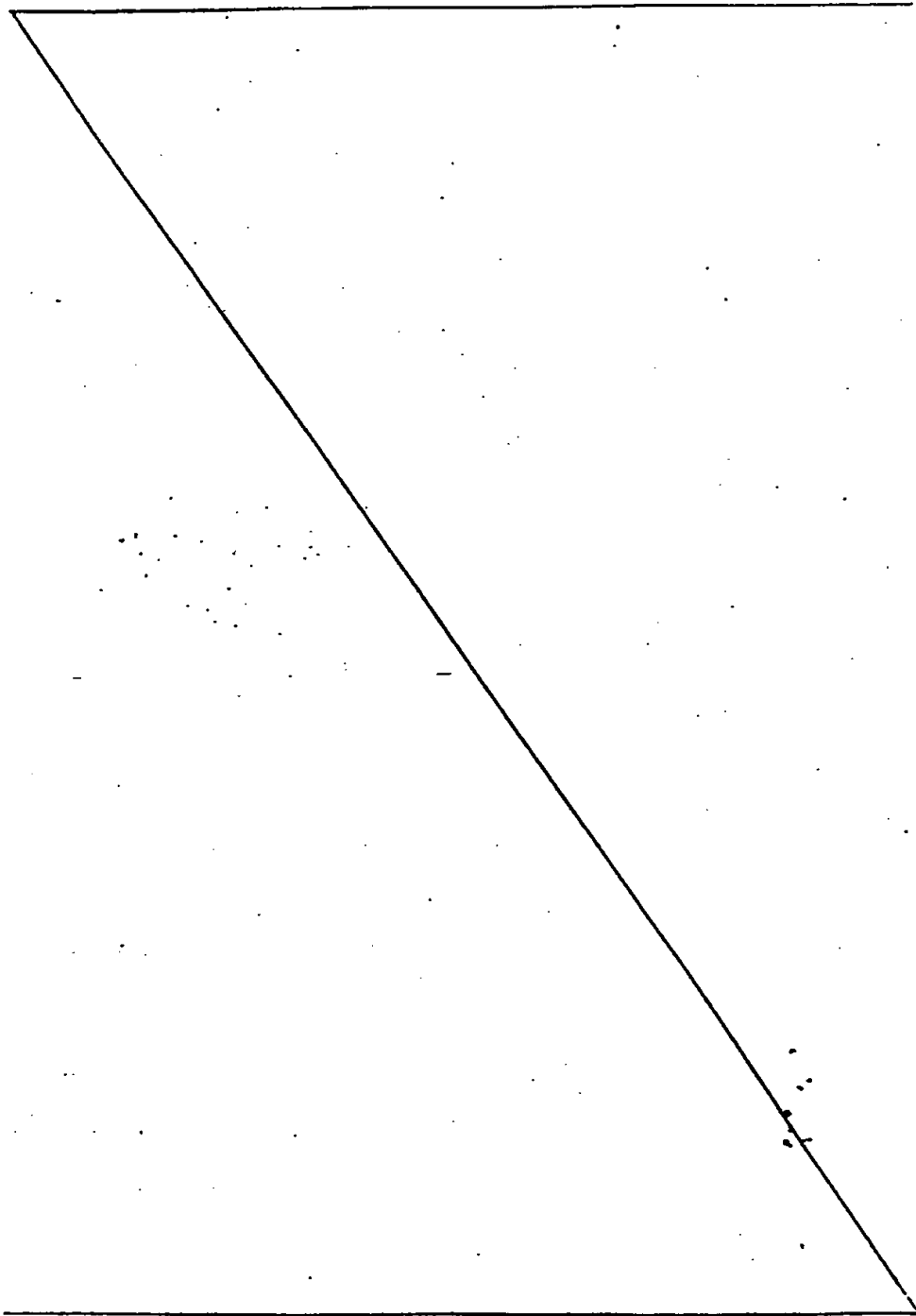
- L'invention vise également les sels pharmaceutiquement
20 acceptables de ces oligosaccharides.

- L'invention vise également un procédé d'obtention des fractions et oligosaccharides évoqués ci-dessus, comportant la dépolymérisation de l'héparine et le traitement du mélange de dépolymérisation résultant afin d'en
25 séparer les fractions renfermant des oligosaccharides constitués au plus par huit motifs saccharidiques (avantageusement ces oligosaccharides eux-mêmes) possédant une affinité pour l'AT III, une activité anti-Xa (Yin-Wessler) élevée et un titre USP très faible.

- 30 L'étape de dépolymérisation est réalisée dans des conditions ménagées afin de ne pas dégrader complètement les chaînes oligosaccharidiques et à conserver les motifs responsables, dans une large mesure, de l'activité anti-Xa (Yin-Wessler).

- 35 De préférence, les conditions de dépolymérisation du procédé défini ci-dessus sont ajustées de manière à conserver le pouvoir d'au moins une partie des oligosaccharides résultants d'être retenus spécifiquement sur de l'AT III immobilisée.

Ces conditions sont choisies de manière à conserver une activité anti-Xa (mesurable par le test Yin-Wessler) chez au moins une partie des oligosaccharides résultants, leur activité anti-coagulante selon le test USP étant pratiquement nulle.



Naturellement, les conditions de dépolymérisation données ci-dessus peuvent être modifiées, elles apparaissent toutefois avantageuses lorsqu'on souhaite obtenir des rendements élevés en oligosaccharides possédant une activité anti-Xa (Yin-Wessler).

- 5 Lorsqu'on dépolymérise l'héparine avec HNO_2 , il apparaît avantageux de réaliser la réaction en milieu aqueux, à un pH de l'ordre de 2 à 4, de préférence de 3, et à une température voisine de l'ambiante.
- 10 Lorsqu'on dépolymérise avec une héparinase, on met en oeuvre de préférence une héparinase hautement purifiée, en particulier, une héparinase d'origine bactérienne, plus spécialement provenant de *Flavobacterium heparinum*. On
- 15 contrôle les conditions afin d'obtenir les fragments les plus courts possédant encore une affinité pour l'ATIII et une activité anti-Xa (Yin-Wessler).

On opère avantageusement à un pH de l'ordre de 6 à 8, en particulier voisin de la neutralité et à une température voisine de l'ambiante. On ajoute l'héparinase portion par portion dans le mélange réactionnel jusqu'à hydrolyse complète.

La dépolymérisation avec l'héparinase peut être, le cas échéant, effectuée sur les fractions résultant des fractions oligosaccharidiques obtenues après dégradation

25 de l'héparine par HNO_2 . On peut également la réaliser avec les oligosaccharides de poids moléculaire élevé qui sont retenus, sur l'ATIII immobilisée, en même temps que les oligosaccharides actifs comportant moins de 8 motifs, et qui sont élués avec ces oligosaccharides à chaînes

30 courtes.

La séparation et la récupération de fractions contenant les oligosaccharides désirés sont avantageusement réalisées par chromatographie d'affinité dans une colonne contenant de l'AT III immobilisée.

- 35 Des résultats satisfaisants sont obtenus en ayant recours à un gel d'agarose commercialisé sous la dénomination Sépharose sur lequel sont immobilisés des motifs d'ATIII.

Pour obtenir la séparation désirée de la majeure partie

des produits contenus dans le mélange de dépolymérisation et ayant une affinité élevée pour l'ATIII, on équilibre avantageusement la colonne avec un tampon ayant une force ionique d'environ 0,2 M, de préférence, supérieure à 0,1 M, à un pH de 6 à 8, de préférence, voisin ou légèrement supérieur à la neutralité.

Les produits dépourvus d'affinité pour l'ATIII ou n'ayant qu'une très faible affinité pour l'ATIII sont éliminés par lavage avec un tampon avantageusement du même type que celui utilisé pour l'équilibrage de la colonne.

Un mode de réalisation préféré pour récupérer les produits retenus ou adsorbés sur l'ATIII, ayant une activité anti-Xa (Yin-Wessler), comprend la désorption et la récupération de tous les oligosaccharides par élution avec un tampon ayant une force ionique suffisante à cet effet.

Le tampon utilisé pour cette élution est alors avantageusement choisi parmi ceux qui n'interfèrent pas avec les étapes de récupération ultérieure (en particulier avec la précipitation alcoolique) des oligosaccharides contenus dans les fractions récupérées.

Un tampon approprié contient un sel de calcium, tel que le chlorure de calcium qui reste soluble en présence d'une concentration en alcool (tout alcool approprié, par exemple l'éthanol) provoquant la précipitation des oligosaccharides. On peut également utiliser un sel de sodium.

Après élution des produits à affinité pour l'ATIII, il est avantageux d'effectuer une précipitation alcoolique aux fins de leur récupération, leur séparation étant ensuite effectuée, par exemple, par centrifugation.

Afin d'obtenir des fractions d'oligosaccharides ayant une forte activité anti-Xa (Yin-Wessler) et un caractère homogène satisfaisant, on soumet le mélange de tous les oligosaccharides initialement retenus sur l'ATIII à une opération de fractionnement, avantageusement par gel filtration, ou encore par chromatographie d'échange d'ions ou les deux ou toute autre méthode qui conduirait à

des résultats similaires.

0027089

On conduit avantageusement l'opération de gel filtration de manière à éluer tout d'abord les plus grosses molécules puis à récupérer les plus petites en commençant avec les fractions qui ont un titre Yin-Wessler et un titre USP dans un rapport d'au moins 30 ou même d'au moins 50, de préférence, de 100 ou supérieur, la récupération s'étendant à toutes les fractions restantes qui possèdent encore une activité anticoagulante au moins dans le test de Yin-Wessler.

Naturellement, selon les quantités de solution soumises à l'opération de gel filtration, on choisira les volumes des fractions successivement éluées afin de retenir celles des fractions les plus appropriées pour l'application souhaitée.

Dans une variante, avant l'étape de fixation sur l'ATIII, on élimine du mélange de dépolymérisation les oligosaccharides comportant plus de 8 motifs saccharidiques et ce, avantageusement par gel filtration ou une technique similaire comme indiqué ci-dessus.

A partir des fractions éluées ci-dessus, on peut séparer des oligosaccharides biologiquement actifs, à savoir des octa-, hepta-, hexa-, penta-, tetra-, et des trisaccharides.

L'étude pharmacologique des fractions et oligosaccharides de l'invention a montré qu'il existe un rapport entre leur activité anti-Xa telle qu'exprimée en unités Yin-Wessler et leur activité antithrombotique.

Ces fractions et oligosaccharides apparaissent capables d'exercer une activité antithrombotique puissante. En raison de leur activité anticoagulante faible et même pratiquement nulle, les risques d'hémorragie sont avantageusement pratiquement éliminés.

Parmi les essais effectués in vivo, pour étudier leur activité antithrombotique, le test suivant a été réalisé sur le lapin selon la méthode de Wessler et al dans J. of appr. Physiol 1959, 14, 943-946.

On a provoqué la formation de caillots dans la veine jugulaire du lapin en injectant un complexe de prothrombine activée.

On a étudié l'effet préventif

de l'octosaccharide ABCDEFGH, possédant un titre Yin-Wessler de 2000 unités par mg, vis-à-vis de la formation de caillots et ce, en injectant l'octasaccharide avant injection de
5 25 unités/kg de complexe thrombogénique.

Lorsqu'on injecte les oligosaccharides avant le complexe de prothrombine activée à des doses de 150 à 250 ui/mg (Yin-Wessler), on obtient une protection importante vis-à-vis de la formation de caillots.

10 Cet octasaccharide possède donc une activité antithrombotique puissante. Avantageusement, on ne peut déceler d'activité anticoagulante globale.

Les fractions oligosaccharidiques de l'invention sont dépourvues de toxicité. L'administration de 10 000 u/kg
15 (titre Yin-Wessler) de l'une des fractions de l'invention ne provoque chez le lapin aucune réaction toxique, ni d'effet pyrogénique. dans le test de pyrogénicité chez le lapin conforme à la pharmacopée française.

Les compositions selon l'invention sont alors
20 particulièrement appropriées pour le contrôle spécifique de certaines étapes de la coagulation chez l'homme ou l'animal, en particulier, lorsqu'on souhaite effectuer un contrôle sélectif de l'activité du facteur Xa du sang (par exemple chez les patients qui ont subi, ou qui vont subir
25 une opération, dans le cas de maladie athéromateuses, de perturbations de mécanismes de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques etc....).

L'invention est donc relative à des préparations pharmaceutiques qui renferment lesdites fractions oligo-
30 saccharidiques ou les oligosaccharides eux-mêmes, à activité anti-Xa élevée.

Elle est plus particulièrement relative à des préparations pharmaceutiques dépourvues de substances pyrogéniques contenant une quantité efficace de principes actifs
35 en association avec des excipients pharmaceutiques.

En particulier, elle concerne les compositions dans lesquelles le véhicule pharmaceutique est approprié pour l'administration par voie orale. Des formes d'administration de l'invention appropriées pour l'administration

par voie orale peuvent être avantageusement des gélules
gastrorésistantes, des comprimés ou tablettes ou des
pilules.

D'autres compositions pharmaceutiques comprennent
5 ces oligosaccharides ou fractions oligosaccharidiques en
association avec les excipients appropriés pour l'adminis-
tration par voie rectale. Des formes d'administration cor-
respondantes sont constituées par des suppositoires.

D'autres formes d'administration de l'invention
10 sont constituées par des aérosols ou des pommades.

L'invention concerne également des compositions
pharmaceutiques injectables, stériles ou stérilisables.

Ces solutions renferment avantageusement 1000 à
100 000 u(Yin-Wessler)/ml d'oligosaccharides ou de fractions
15 oligosaccharidiques, de préférence de 5000 à 50 000, par
exemple de 25 000 u/ml, lorsque ces solutions sont des-
tinées à l'injection par voie sous-cutanée. Elles peuvent
contenir, par exemple, de 500 à 10 000, notamment 5000
u/ml d'oligosaccharides ou de fractions oligosaccharidiques
20 lorsqu'elles sont destinées à l'injection par voie intra-
veineuse ou par perfusion.

Avantageusement, de telles préparations pharmaceu-
tiques sont présentées sous la forme de seringues non
récupérables, prêtes à l'emploi.

25 L'invention concerne également les compositions
pharmaceutiques contenant lesdits oligosaccharides en asso-
ciation avec un autre principe actif, utilisable en
particulier pour la prophylaxie et le traitement de throm-
bose, tel qu'un agent veinotonique comme la dihydroergo-
30 tamine, un sel d'acide nicotinique ou un agent thromboly-
tique comme l'urokinase.

Les fractions oligosaccharidiques et oligosaccha-
rides de l'invention sont avantageusement sous la forme
de sels d'au moins un métal physiologiquement acceptable
35 tel que le sodium et/ou le calcium et/ou le magnésium.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention
sont particulièrement adaptées pour le contrôle (préven-
tif ou curatif) de certaines étapes de la coagulation du sang
chez l'homme ou l'animal, notamment dans le cas où le patient

est soumis à des risques d'hypercoagulabilité résultant notamment de la libération par l'organisme de thromboplastines, par exemple, de thromboplastines tissulaires (opérations chirurgicales), processus athéromateux, développement de tumeurs et troubles de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques, etc....).

Afin d'illustrer l'invention, on indique, ci-après, un exemple de posologie utilisable chez l'homme :

cette posologie comprend, par exemple, l'administration au patient de 1000 à 25000 u par voie sous-cutanée, deux ou trois fois par jour, selon le niveau des risques d'hypercoagulabilité ou la condition thrombotique du patient, ou de 1000 à 25 000 u/24 heures par voie intraveineuse, en administrations discontinues à intervalles réguliers, ou continues par perfusion, ou encore de 1000 à 25000 u (trois fois par semaine) par voie intramusculaire (ces titres sont exprimés en unités Yin-Wessler). Ces doses peuvent être naturellement ajustées pour chaque patient en fonction des résultats et des analyses de sang effectuées auparavant, la nature des affections dont il souffre et, d'une manière générale, son état de santé.

L'invention se rapporte également à l'application des oligosaccharides de l'invention et des fractions qui les renferment, à la constitution de réactifs biologiques, utilisables en laboratoires notamment comme éléments de comparaison pour l'étude d'autres substances dont on souhaite tester l'activité anticoagulante, notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa.

Elle vise également l'application des fractions et oligosaccharides en médecine nucléaire, en tant que produits radiopharmaceutiques. Les oligosaccharides et fractions définis ci-dessus sont marqués par des traceurs choisis parmi ceux couramment utilisés dans ce domaine, et notamment à l'aide de technétium 99 m.

A cet effet, on transforme le technétium 99m obtenu à partir de générateurs du commerce, sous forme de pertechnétate de sodium de valence 7 non réactif,

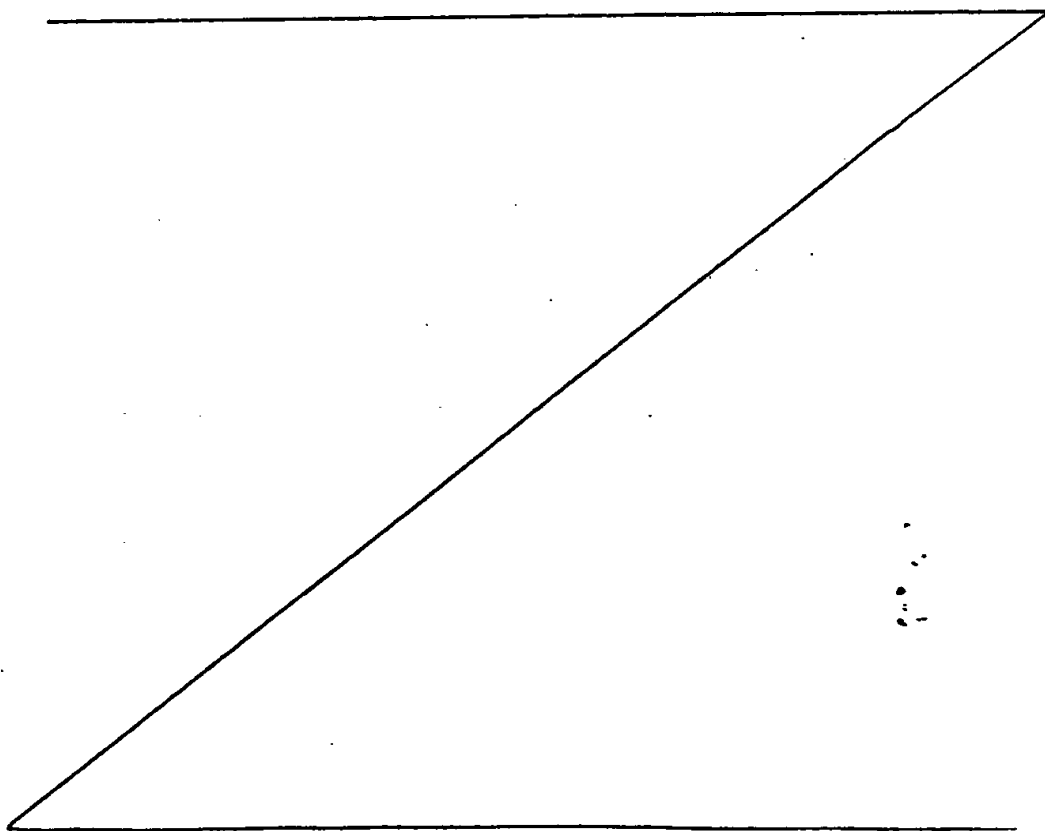
en technétium réduit de valence 4 qui serait la forme la plus réactive du technétium. Cette transformation est effectuée grâce à un système réducteur réalisé à partir de sels d'étain (chlorure stanneux), de sels de fers 5 (sulfate ferreux), de sels de titane (trichlorure de titane) ou autres sels.

La plupart du temps, cette simple réduction du technétium suffit dans des conditions de pH donné, à réaliser la fixation du technétium sur la molécule considérée.

10 On peut utiliser les produits de l'invention, qui constituent en quelque sorte un support, à des doses de l'ordre de 100 à 200 ui Yin-Wessler.

Pour l'élaboration de ces radiopharmaceutiques, on peut opérer conformément à la méthode de P.V KULKARNI et al 15 dans The Journal of Nuclear Medecine 21, No 2, p 117-121.

Les produits ainsi marqués sont avantageusement utilisés dans des tests in vivo pour la détection et le diagnostic d'extension des thromboses et des états thrombotiques.



D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit des exemples et en se référant aux dessins.

EXEMPLE 1 :

5 Procédé d'obtention de fractions oligosaccharidiques comprenant les étapes de :

I - Dépolymérisation d'héparine avec HNO_2 ,

10 II - séparation des oligosaccharides biologiquement actifs par chromatographie sur Sépharose - AT III

III - gel filtration des fractions éluées et récupération des produits désirés.

I Dépolymérisation d'héparine en présence d'acide nitreux -

On dissout 20 g d'héparine (titre USP : 150 UI/mg, titre YIN-WESSLER : 150 UI/mg) dans 800 ml d'eau à température ambiante.

On ajoute 200 ml d'acide sulfurique 0,5 M puis 13,8 g de nitrite de sodium (molarité finale de l'acide sulfurique : 0.1 M, et du nitrite : 0.2 M).

20 La réaction s'accompagne d'un dégagement d'azote gazeux. On arrête la réaction au bout de 15 minutes en ajustant le pH à 7-7,2 avec de la soude 5 N.

Les produits de dépolymérisation sont précipités par de l'éthanol (7 volumes), à savoir, dans ce cas, 7 litres.

Le précipité est centrifugé, lavé avec de l'alcool et séché sous vide.

On récupère 24,8 g de produit ayant un titre USP nul et un titre YIN-WESSLER de 7 UI/mg.

30 L'augmentation apparente de poids du précipité résulte de la précipitation partielle du sulfate de sodium avec les produits de dépolymérisation.

II Chromatographie sur SEPHAROSE- AT III

Les produits de dépolymérisation obtenus sont soumis à une chromatographie sur gel de SEPHAROSE sur lequel sont retenus des motifs d'AT III.

Avec un tampon constitué par NaCl 0.2 M, tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, on équilibre une colonne (de 2,6 cm de diamètre et de 40 cm de hauteur) contenant 200 ml de SEPHAROSE-

AT III (approximativement 10 mg d'AT III bovine immobilisée par ml de SEPHAROSE).

On dissout 1,6 g des produits de dépolymérisation ci-dessus dans 16 ml d'un tampon NaCl 0,2 M et on fait passer cette solution à travers une colonne à une vitesse de 50 ml par heure, puis on rince la colonne avec 500 ml d'un tampon NaCl 0,2 M.

Les oligosaccharides retenus sont ensuite élués de la colonne à l'aide d'un tampon capable de désorber tous les oligosaccharides retenus sur l'AT III immobilisée (CaCl₂ 0,2 M, tris-HCl 0,05 M, pH 7,2). On récupère la partie de l'effluent qui contient les oligosaccharides, et on précipite ces oligosaccharides à l'aide de 10 volumes d'éthanol.

Après lavage avec de l'éthanol et séchage sous vide, on récupère 5 mg de produit ayant un titre USP de 66 UI/mg et un titre YIN WESSLER de 1 600 UI/mg.

Les produits ainsi obtenus sont constitués par un mélange de mucopolysaccharides de poids moléculaire élevé et d'oligosaccharides de faible poids moléculaire.

20 III Gel filtration

On dissout dans 2 ml d'eau distillée 90 mg d'un mélange de mucopolysaccharides et d'oligosaccharides obtenus par un procédé dont les paragraphes précédents sont représentatifs. On dépose cette solution au sommet d'une colonne (hauteur 1 m, diamètre 2,6 cm) de gel filtration formée de particules extrêmement fines commercialisées sous la dénomination SEPHADEX G 50, cette colonne étant équilibrée avec de l'eau distillée. On réalise l'élution avec de l'eau distillée à une vitesse de 26 ml/h. On recueille l'effluent par fractions (6 ml par tube). On évalue la teneur en mucopolysaccharides de chaque tube par absorption UV à 206 nanomètres.

Les contenus des tubes sont réunis pour former les fractions numérotées 1 à 5.

Les mucopolysaccharides contenus dans chacune de ces fractions sont précipités par de l'alcool et séchés.

On indique ci-après les poids et les propriétés anticoagulantes de ces fractions :

fraction (1)	Poids	:	15 mg
	Titre USP	:	156 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	190 U/mg

5 fraction (2)	Poids	:	16 mg
	Titre USP	:	139 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	520 U/mg

10 fraction (3)	Poids	:	17 mg
	Titre USP	:	50,3 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	1 390 U/mg

15 fraction (4)	Poids	:	40 mg
	Titre USP	:	7 UI/mg
	Titre YIN-WESSLER	:	870 U/mg

20 fraction (5)	Poids	:	1 mg
	Titre USP	:	nul
	Titre YIN-WESSLER	:	150 U/mg

On étudie les domaines de poids moléculaire des fractions ainsi obtenues, en particulier de la "fraction 4" et de la "fraction 5", à la fois par chromatographie sur papier et par Chromatographie Liquide sous Haute Pression 25 (HPLC) et on effectue une étude comparative en considérant les résultats obtenus selon les mêmes conditions expérimentales avec un decasaccharide d'héparine et :

- par chromatographie sur papier, avec les produits de référence décrits dans l'article de SILVA et 30DIETRICH (SILVA M. E. et DIETRICH C. P. , J. Biol. chem. Vol. 250 (1975) p. 6 841 - 6 846), et

- par HPLC sur gel de silice, avec une série de polystyrene-sodium sulfonates ayant des poids moléculaires connus allant en augmentant et des échantillons d'héparine 35 de poids moléculaires connus.

la "fraction 4" apparaît constituée par un oligosaccharide possédant moins de 8 motifs saccharidiques et probablement pas plus de 6 motifs saccharidiques, et la "fraction 5" d'un oligosaccharide possédant moins de 6 mo-

tifs saccharidiques, plus vraisemblablement pas plus de 4 motifs saccharidiques.

EXEMPLE 2

Procédé d'obtention de fractions oligosaccharidiques comprenant les étapes de :

- A - dépolymérisation de l'héparine par digestion avec une héparinase ;
- B - fractionnement du mélange de dépolymérisation par gel filtration sur DEAE Sephadex A 25 ;
- 10 C - isolement des produits biologiquement actifs par chromatographie sur agarose - AT III.

A Dépolymérisation de l'héparine par digestion avec une héparinase

1° Préparation de l'héparinase :

15 Pour la dégradation de l'héparine on utilise des enzymes de *Flavobacterium heparinum*.

Les enzymes de *Flavobacterium heparinum* sont cultivés selon la méthode de Payza et Korn, décrite dans J.

Biol. Chem. 1956, 223, p. 853 - 858. Les cellules lyophilisées
20 sont broyées à sec en présence d'alumine puis extraites par un tampon acétate à pH neutre.

Les parties insolubles sont éliminées et la solution obtenue est successivement chromatographiée sur DEAE puis sur deux agaroses tels que ceux commercialisés sous
25 les dénominations CM Sepharose CL 6B et Ultrogel ACA 54.

On obtient ainsi 20 mg d'héparinase ayant un degré de pureté de 90 % (cette pureté est évaluée par électrophorèse) et un titre de 30 000 unités/mg (8 333 unités telles que mesurées selon la méthode de HOVINGH et al
30 (1970), J. Biol. Chem. 245, 6, 1970).

2° Dépolymérisation de l'héparine

On dissout dans 50 ml d'eau distillée 1 g d'héparine pour utilisation thérapeutique. On ajoute 1 g d'acétate de sodium et 100 mg de chlorure de calcium. On ajuste le
35 pH à 7,2 par addition de HOC1. 1 N.

On ajoute ensuite 1 mg d'une solution d'héparinase hautement purifiée telle qu'obtenue ci-dessus, et l'on soumet le mélange à incubation pendant 15 heures à 30°C. Après précipitation par 10 volumes d'éthanol à 100° GL,

on sèche le produit dépolymérisé obtenu. Ce produit sera désigné ci-après par P.

B Fractionnement sur "DEAE SEPHADEX A 25"

Avec un tampon NaCl 0.1 M, pH 7,0 on équilibre une colonne de 16 mm de diamètre renfermant 50 ml de gel connu sous la dénomination indiquée sous B. On dépose 20 ml d'une solution renfermant 180 mg dudit produit P dans le tampon, puis on élue avec un gradient de NaCl selon lequel on utilise au départ 250 ml d'un tampon NaCl 0.1 M, puis d'un tampon CaCl_2 0.5 M, pH 7,0. La vitesse d'élution est ajustée à 30 ml/h. On récupère des volumes successifs de 10 ml.

Sur la figure 1 on a représenté le diagramme d'élution suivi par mesure de la densité optique à 232 nm. Les volumes sont réunis en fractions 1, 2, 3, 4 selon les mesures de densité optique, comme montrées sur la figure 1. Leurs densités optiques respectives sont données dans le tableau 1 qui suit.

TABLEAU I

20	No fraction	Poids	Rendement en poids % à partir de 120,8 mg de produit de départ	$[\alpha]_D^{20}$ (c=1, eau) sur la bande D du sodium	232 nm DO. H_2O (conc: 1 mg/ml)
25	1	22 mg	18 %	+ 33°	2,1
30	2	69 mg	57 %	+ 30°	3,2
35	3	20 mg	16 %	+ 30°	2,6
40	4	9,8mg	8 %	+ 21°	1,7

C Chromatographie d'affinité sur agarose - AT III de la deuxième fraction

Avec un tampon NaCl tris-HCl 0,025 M, pH 7,4, on équilibre une colonne ayant un diamètre de 2,5 cm contenant 50 ml d'agarose, sur laquelle sont immobilisées des molécules d'AT III (Agarose-AT III).

On dissout dans 6 ml du tampon en question 60 mg de la fraction n° 2 (P2) du tableau I, puis on dépose la solution au sommet de la colonne. On effectue l'élution avec des solutions successives :

Le premier éluant utilisé est le même que celui indiqué ci-dessus (on sépare ainsi un éluant contenant 50 mg du produit désigné par P 2 (B) contenu dans le premier pic détecté de densité optique à 232 nm); en changeant d'éluant et en utilisant NaCl 0,2 M tris-HCl 0,05 M, de pH 7,4, on ne désorbe aucune fraction active du gel ; en utilisant ensuite comme éluant CaCl_2 2 M on obtient un pic (les volumes renfermant les fractions qui donnent naissance à ce pic sont précipités par de l'alcool et fournissent 5 mg de fraction à activité élevée (produit désigné par P 2 (A)).

Les caractéristiques physiques et biologiques de cette dernière fraction sont les suivantes :

titre YIN-WESSLER : 1 400 unités/mg
[α] $^{20}_D$ = + 24° (c = 1, eau)
DO. $^{235}_{nm}$ = 4,5
HCl 0,03 N

Les résultats de l'analyse de P 2 (A) sont donnés ci-dessous :

1° Analyse chimique

On dose les constituants de P 2 (A) en ce qui concerne :

- les acides uroniques selon la méthode de Bitter T. et al. , Anal. Biochem., 4 (1962), 330-334 .
- les hexosamines, d'une part par la méthode de Elson-Morgan, telle que modifiée par Antonopoulos C.A. et al., Biochem. Biophys. Acta 83 (1964), 1-19 (après hydrolyse de P 2 (A) par HCl 6N pendant 4 heures, à 110°C sous atmosphère d'azote), et d'autre part par la méthode de Smith R. L. et Gilkerson E., Anal. Biochem., 98 (1979),

478-480, sur des échantillons soit non-hydrolysés, soit hydrolysés de P 2 (A) ;

- les sulfates, par la méthode de T. T. Terho et al., Anal. Biochem., 41 (1971), 471-476.

- 5 Les résultats relatifs à la composition sont résumés dans le tableau II qui suit, exprimés en pourcentages en poids (première ligne), en rapport molaire par rapport aux motifs glucosamine après hydrolyse (H^+) selon la technique de Smith et Gilkerson (deuxième ligne).

10

TABLEAU II

	Acides uroniques	Hexosamines		Sulfates
		Smith-Gil.	Antonopoulos	
		H^+		
15 P 2 (A)	15,2 %	18,7 %	12,8 %	12 %
	0,9	1,0	0,7	1,4

- 20 Ces résultats montrent que les oligosaccharides de l'invention comprennent essentiellement :

- 1 mole d'acide uronique par mole d'hexosamine ;
- 1,4 mole de sulfate par motif disaccharidique (comportant un motif uronique et un motif hexosamine) ;
- 25 - des motifs 2 N-sulfate-glucosamine par motif 1 N-acetyl-glucosamine.

2° Chromatographie liquide sous haute pression

- 50 μ l d'une solution de 0,5 mg/ml de P 2 (A) sont soumis à une élution à l'aide de Na_2SO_4 0,02 M (1 ml/mi-
 30 nute) à travers une première puis une deuxième colonne (250 X 4,6 cm) contenant respectivement de la silice commercialisée sous la dénomination LICHROPHOSPER Si 100 et une troisième colonne (250 X 3 cm) remplie d'un matériau commercialisé (par WATERS et Associates) sous
 35 la dénomination micro-BONDAGEL. Le poids moléculaire de la fraction selon l'invention est apprécié en fonction du temps d'élution (ou de rétention sur les colonnes),

en se référant aux variations linéaires des temps de rétention de polystyrene-sulfonates standards de poids moléculaires connus (respectivement 4 000, 6 500, 16 000 et 31 000) ainsi qu'avec un tétrasaccharide ayant un poids moléculaire connu de 700 à 900 soumis aux mêmes déterminations, exprimé en valeur logarithmique correspondant auxdits poids moléculaires. Les mesures ont été effectuées sur un chromatographe : SPECTRAPHYSICS 3 500, et la détection des fractions par spectrophotométrie UV (200 mμ et 230 mμ).

Cette détermination ainsi que les autres déterminations chimiques selon la méthode de A. Linker et P. Hovingh, Biochem. volume 11, n° 4, 1972, p. 563-567, confirme que les oligosaccharides actifs ne renferment pas plus de 8 motifs saccharidiques.

3° absorption en ultra-violet

On effectue les mesures d'absorption UV sur une solution de 100 γ/ml de P 2 (A), dans une bande UV de 215 à 260 nm. L'absorption maximale est observée à 230-235 nm.

EXEMPLE 3

Procédé d'obtention de fractions oligosaccharidiques comprenant les étapes de :

- I dépolymérisation enzymatique de l'héparine ;
- II isolement des produits biologiquement actifs par chromatographie sur Sépharose-AT III ;
- III gel filtration des fractions éluées et récupération des produits désirés.

I Dépolymérisation enzymatique de l'héparine

On dissout 2 g d'héparine pour utilisation thérapeutique dans 100 ml d'un tampon acétate (NaOAc 0,15 M, NaCl 0,15 M ; Ca Cl₂ 0,005 M ; pH 6,9).

On soumet la solution à incubation pendant 24 heures à 30°C.

L'héparinase hautement purifiée précédemment obtenue est ajoutée à la solution comme suit :

0,4 mg (quantité basée sur le dosage de protéines)

au temps $t = 0$,

0,2 mg au temps $t = + 8$ heures,

0,2 mg au temps $t = + 24$ heures.

0027089

A $t = + 36$ heures, une autre addition d'hépari-
nase ne provoque pas une augmentation de la densité op-
tique à 232 nm. On considère que la réaction est termi-
5 née et que les produits sont récupérés par précipitation
alcoolique et séchés (rendement en pourcentage en poids
90 %).

2 - Chromatographie d'affinité sur Sépharose-AT III des produits dépolymérisés

10 On équilibre avec un tampon Na Cl 0,1 M, tris-
HCl 0,05 M, pH 7,5 une colonne de chromatographie
(5 X 18 cm) contenant 10 mg d'AT III immobilisée par ml
de Sépharose.

On dépose 2 g des produits de dégradation de
15 l'héparine en haut de la colonne.

On lave la colonne avec ledit tampon, ce qui per-
met d'éliminer les fractions non fixées (les produits
correspondants seront désignés ci-après par UP).

Les produits fixés (désignés par F P) sont ensuite
20 élués avec une solution de CaCl_2 1 M pH 7,2.

Les produits sont précipités avec de l'alcool et
récupérés par centrifugation. On récupère d'une part
1,6 g de UP, et d'autre part 8 mg de FP ayant une activi-
té (Yin-Wessler) de 800 ui/mg.

25 3 - Gel filtration

Les produits UP et FP sont soumis séparément à
une gel filtration. 25 mg de chacun des produits sont
filtrés sur une colonne (200 X 0,6 cm) d'un gel de Se-
phadex G 50 Superfine.

30 On réalise l'élution à l'aide d'une solution de
NaCl 0,2 M. On recueille des fractions de 0,65 ml. Après
élimination des sels sur Sephadex G 25, on lyophilise
les produits.

Sur la figure 2 on a représenté les diagrammes
35 d'élution des fractions UP (courbe en continu) et des
fractions FP (courbe en pointillés)

L'élution est contrôlée par mesure de la densité optique à 230 nm (longueur d'onde d'absorption de la double liaison créée par l'héparinase).

Conformément aux mesures de densité optique, on fractionne UP en di-, tetra-, hexa-, et octasaccharides (UP_2 , UP_4 , UP_6 et UP_8) et en un autre produit ayant un degré de polymérisation supérieur (UP_{+8}). UP_8 et UP_{+8} n'apparaissent pas sur les courbes d'élution de la figure 2 car ils représentent un trop faible pourcentage (3,4 et 1,3% respectivement) et sont seulement détectés à sensibilité élevée.

La fraction FP est séparée en quatre fractions, désignées respectivement par FPa, b, c, et d, selon le volume décroissant d'élution. La majeure partie des fractions FP est éluee légèrement avant la fraction UP_6 .

Dans le tableau 3, ci-après, on rapporte les résultats concernant chacune des fractions UP et FP.

Ces résultats comprennent : le volume d'élution (ml) de chacune des dites fractions provenant des fractions UP et FP ; le pourcentage de chacune de ces fractions dans le mélange des fractions respectivement UP et FP ; le pouvoir rotatoire spécifique de chacune des fractions, (mesuré avec un polarimètre électronique en solution aqueuse, généralement à 1%) ; l'absorbance à 230 nm (mesurée dans une solution à 0,01% de HCl 0,03M, les résultats étant exprimés en densité optique d'une solution 1 pour 1000 ; et l'activité anti-Xa dans le plasma humain des fractions FP, mesurées selon le test de Yin-Wessler dont question ci-dessus.

0027089

TABLEAU

Fraction	Volume d'élution (ml)	% dans le mélange	\bar{L}_D^{20} (c = 1, eau -) sur la bande D du so- dium	230 nm DO. H ₂ O	Activité anti-Xa ui/mg Yin-Wessler
UP 2	52-60	52	+ 5	6	-
UP 4	47-52	30,5	+ 23,5	4,8	-
UP 6	43-47	13	+ 37	3,3	-
UP 8	40-43	3,4	+ 41,5	2,5	-
UP +8	37-40	1,3		2	
FPa	40-45	50	+ 39	3,2	1200 (2000 dans d'autres tests)
FPb	35-39	23	+ 41	2,5	930
FPc	27-34	14	-	-	200
FPd	23-26	5	-	-	330

30

Il ressort des résultats donnés dans le tableau ci-dessus que chacune des fractions FP possède une activité anti-X₃. L'activité la plus importante apparaissant dans la fraction FPa. On notera que cette fraction présente 50 à 60% du mélange FP.

La fraction FPa a été soumise à plusieurs traitements afin d'élucider sa structure. Les résultats analytiques suivants ont été obtenus :

- Dégradation de FPa par traitement avec de l'acide nitreux -

10 Les fractions FPa récupérées après la gel filtration sont incubées avec HNO₂ en milieu aqueux dans des conditions permettant la dégradation des chaînes d'oligosaccharides. La dégradation est réalisée selon la méthode de Shiveley et Conrad, décrite dans Biochemistry 1976, 15, 15 3932-3942.

Sous l'action de HNO₂, les chaînes oligosaccharidiques sont fragmentées en di- et tetrasaccharides, la coupure intervenant après les motifs N-sulfate glucosamine, ces motifs étant transformés en groupes, 2,5-anhydromannose.

On sépare par chromatographie sur Séphadex G50 les di- et tetrasaccharides ainsi obtenus (200 x 0,5 cm ; NaCl 0.2M)

Le diagramme d'élution est donné sur la figure 3.

25 On effectue les mesures suivantes sur chacune de ces fractions : la densité optique à 230 nm (courbe a) la quantité d'acide uronique (courbe b), de 2,5-anhydromannose (courbe c) et de glucosamine (avant et après hydrolyse acide), la radioactivité lorsque les produits 30 analysés ont été tritiés avant d'être dégradés par HNO₂.

La mesure de la densité optique des fractions montre que la majeure partie des molécules insaturées sont des disaccharides, 90% de la densité optique apparaissant 35 dans le pic du disaccharide tandis que 10% apparaissent dans le pic du fragment tetrasaccharidique.

On peut alors considérer que l'unité tetrasaccharidique ne renferme pas de motifs acide uronique avec une double liaison. Un tel motif fait partie du disaccharide

qui contient en outre une N-sulfateglucosamine, ce disaccharide GH étant localisé à l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide avant sa dégradation nitreuse. En outre, en dosant les groupes 2,5-anhydro-mannose dans ces fractions (courbe c dans la figure 3), on trouve 33% des groupes 2,5-anhydro-mannose dans les fragments tetrasaccharidiques et 66% dans les fragments disaccharidiques. En considérant que les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des groupes N-sulfate-glucosamine, on peut conclure de ces résultats que la fraction FPa contient deux chaînes disaccharidiques pour une chaîne tetrasaccharidique (voir courbe b sur la figure 3). Ces résultats sont confirmés par le dosage des acides uroniques (courbe b) selon Bitter et Muir dans Annal. Biochem. 1962, 4, 330-334 et des motifs glucosamine dans les produits dégradés provenant de FPa : ces produits de dégradation comprennent deux fois plus de motifs disaccharidiques que de motifs tetrasaccharidiques.

20 - Réduction de la fraction FPa par du borohydrure de sodium suivie par une dégradation nitreuse -

On réduit la fraction FPa avant dégradation nitreuse. Ainsi les extrémités réductrices des chaînes ne sont pas transformées en groupes 2,5-anhydro-mannose durant la dégradation nitreuse.

On effectue la réduction avec un tampon de borohydrure de sodium à pH 9,5. Les extrémités réductrices des chaînes oligosaccharidiques FPa sont alors transformées en hexitols tritiés. Le produit réduit est séparé des sels présents dans le mélange par filtration sur Séphadex G25. On le soumet ensuite à une dégradation par de l'acide nitreux, puis à une gel filtration comme décrit ci-dessus. Le dosage des groupes 2,5-anhydro-mannose est alors réalisé et montre une diminution nette de ces groupes dans la fraction disaccharidique tandis que les fractions tetrasaccharidiques restent pratiquement inchangées.

En réduisant avec du borohydrure tritié, 70 à 80% de la radioactivité est retrouvée dans les disaccharides et

20 à 30% dans les tetrasaccharides. En outre, on observe qu'après ce traitement, la quantité de 2,5-anhydro-mannose diminue beaucoup plus dans le disaccharidique que dans le pic tetrasaccharidique : un tel résultat est en faveur de la présence d'un fragment disaccharidique à l'extrémité réductrice (70% des molécules) et aussi d'un tetrasaccharide (30%).

- Dégradation par l'acide nitreux de la fraction FPa sous des conditions très ménagées -

10 La fraction FPa est soumise à une dégradation par de l'acide nitreux dans des conditions très ménagées.

Il est alors possible, après gel filtration et chromatographie d'affinité, d'isoler une fraction oligosaccharidique contenant principalement les deux hexasaccharides possédant les séquences ABCDEF et CDEFGH, ces dernières faisant également partie de l'invention.

Dans ce procédé, on soumet FPa à l'action de l'acide nitreux selon la méthode décrite par CIFONELLI et KING (Carbohydrate Res. 1972, 21, 173-186), la réaction étant toutefois arrêtée après une à cinq minutes, de préférence au bout de trois minutes.

On élimine les sels des fragments ainsi obtenus par gel filtration sur Séphadex G25 puis on soumet les fractions recueillies à une chromatographie d'affinité dans les conditions décrites ci-dessus.

Les méthodes analytiques décrites ci-dessus pour l'étude de la fraction FPa, montrent qu'on dispose dans les fractions éluées de deux espèces principales, à savoir CDEFGH et ABCDEF. Ces fractions possèdent encore une activité anti-Xa (Yin-Wessler).

- Caractérisation par RMN d'une fraction octasaccharidique -

On isole une fraction octasaccharidique en opérant comme décrit ci-dessus. Cette fraction présente un titre Yin-Wessler de 2000 unité/mg et un titre APTT de 4 μ l/mg

Le spectre RMN C^{13} de ce produit est donné sur la figure 5. Il confirme que le produit est un octasaccharide. Il confirme également qu'il possède la structure attribuée avec la séquence ABCDEFGH.

Les signaux observés sont respectivement caractéristiques de :

- un carbone anomère en position 1 dans les différents motifs (ABCDEFGH et H) de la structure (le motif correspondant étant mentionné pour chaque pic sur la figure pour permettre son identification 90-105 ppm environ).
- des carbones en position 6 (signal C_6) env. 60 et 70ppm et en position 2 (signal C_2) des motifs glucosamines (55-60ppm)
- CH_3 du groupe -NHAc dans D (environ 25 ppm).

En outre, on observe la présence d'un signal de résonance dans la région C-2 des résidus N-sulfate-amino-glucosamine (signal *), ce signal ne correspondant à aucun signal de résonance des spectres RMN obtenus en opérant dans des conditions similaires avec une héparine usuelle.

EXAMPLE 4 -

-Isolément d'une fraction hexasaccharidique active vis-à-vis du facteur Xa -

Dans une autre série d'expériences, le mélange obtenu, après l'étape de chromatographie d'affinité, (80 mg) est chromatographié sur une colonne (200x 2,5 cm) d'un gel de Séphadex G50 superfine.

On réalise l'élution avec du chlorure de sodium 0,2M. Les produits sont détectés par absorption U.V. à 232 nm (voir figure 4).

La majeure partie du produit est éluée dans la région octasaccharidique et présente les mêmes propriétés que le produit précédemment décrit.

La fraction hexasaccharidique est réunie et les sels sont éliminés. Le produit ainsi obtenu est séché par congélation, le rendement est de 2 mg.

Ce composé présente une haute activité Yin-Wessler de 510 ui/mg. Son titre APTT est de 3ui/mg.

Etant donné que cette fraction hexasaccharidique est obtenue après dégradation par l'héparinase, elle contient les résidus A et H caractérisés dans la fraction octasaccharidique. En outre, étant donné que ce produit présente une affinité pour l'ATIII, il doit contenir la séquence tétrasaccharidique CDEF. Il peut donc être

représenté par la structure ABCDEF.

On ne peut cependant exclure la présence dans ce matériau de faibles quantités d'un produit ayant la structure CDEFGH où C est un résidu d'acide hexuronique insaturé (le groupe 2-OH étant sulfaté ou non).

L'étude analytique de cette fraction hexasaccharidique-effectuée comme décrit ci-dessus pour l'octasaccharide (à savoir dégradation par l'acide nitreux et étude des fragments) - indique la présence à la fois de ABCDEF et CDEFGH.

EXEMPLE 5 -

- Dégradation de l'octasaccharide ABCDEFGH et oligosaccharides obtenus -

1. En opérant conformément à la méthode décrite par L.A. Fransson dans Carbohydrate Research 62,235-244, 1979, on soumet l'octasaccharide ABCDEFGH à une réaction d'oxydation à l'aide de periodate de sodium en milieu phosphate, à pH 7 à 37°C pendant 14 heures environ. On porte ensuite le pH à 11-12 par addition de soude pour provoquer une hydrolyse alcaline puis on neutralise le mélange réactionnel. Une chromatographie sur gel de Sephadex G 50 permet de séparer un trisaccharide auquel on peut attribuer la structure FGH.

L'étude de l'activité anti-Xa, selon le test Yin-Wessler permet de mettre en évidence une activité de l'ordre de 100 à 200 ui/mg selon les essais

2- On laisse agir une héparitinase purifiée, extraite de Flavobacterium heparinum sur l'octasaccharide dont question ci-dessus. Les conditions opératoires notamment de pH, température, durée, correspondent à celles mises en oeuvre dans la dégradation enzymatique selon l'exemple 2. Par filtration sur un gel de Séphadex G-50, effectuée comme dans l'exemple 2, on récupère, à partir du mélange de polymérisation, deux tétrasaccharides auxquels on peut attribuer les structures EFGH et ABCD.

Le passage de ces produits sur une colonne de Sépharose ATIII permet de retenir EFGH tandis que ABCD est éliminé. On récupère ensuite EFGH par élution avec une solution NaCl 1 M. L'activité Yin-Wessler mesurée

dans différents essais est de l'ordre de 100 à 200 ui/mg.

- 3- On soumet l'octasaccharide ABCDEFGH à une dégradation nitreuse ménagée. On met 1 mg d'octasaccharide par ml de solution et on produit de l'acide nitreux (à une concentration voisine de 1 m M) in situ par addition de nitrite de sodium N et de HCl . On ajuste le pH à 3. Au bout de 10 mn, 1000 à température ambiante, on ajuste le pH à 7. Le mélange réactionnel est soumis à une opération de gel filtration suivie d'une chromatographie d'affinité selon les conditions décrites dans les exemples précédents.

- Par élution avec une solution de NaCl 1M ou de CaCl_2 1M, on recueille un produit auquel on peut attribuer une structure hexasaccharidique CDEFGH.

- Cet hexasaccharide est soumis à l'action d'une α -L-iduronidase, extraite de rein humain. Cette étape de dégradation enzymatique est réalisée à un pH 7 à 37°C. par filtration du mélange de dépolymérisation sur une colonne de Séphadex G50, on isole un oligosaccharide auquel on peut attribuer la structure d'un pentasaccharide DEFGH. L'activité Yin-Wessler de ce produit apparaît être de l'ordre de 400 ui/mg dans les tests réalisés.

Exemple 6 -

- 25 - Caractérisation par RMN de la fraction oligosaccharidique obtenue dans l'exemple 1 -

- Le spectre RMN (C^{13}) de cette fraction montre la présence d'un signal \times dans la région du C-2 des motifs glucosamine (voir figure 6). Ce signal peut être attribué à une glucosamine qui est N-sulfatée et substituée en position 3 par un groupe $-\text{OSO}_3^-$.

Ce motif glucosamine est sulfaté ou non en position 6.

- En outre, la courbe d'intégration confirme que le produit possède un nombre moyen de motifs inférieur à 8 et comprend une majeure partie d'espèces hexasaccharidiques et octosaccharidiques

En partant d'héparine de langue de boeuf, après dégra-

dation contrôlée, suivie d'une chromatographie d'affinité et d'un gel filtration comme décrit ci-dessus, on peut isoler un octasaccharide ayant la structure ABCFGHGH, ce produit est hautement actif dans les tests anti-Xa.

On extrait également, en faible quantité, un hexasaccharide ABCFGH, qui s'avère également actif dans les essais anti-Xa.

L'invention s'étend naturellement aux oligosaccharides qui peuvent être obtenus par d'autres techniques de dépolymérisation de l'héparine ou de composés hépariniques, suivies par les étapes de récupération des oligosaccharides à faible poids moléculaire ayant une activité anticoagulante mesurable par le test Yin-Wessler.

Comme exemple d'autres techniques de dépolymérisation de l'héparine ou de composés proches, on peut citer l'oxydation périodique. On peut également citer la technique qui consiste à provoquer une réaction d' α, β -élimination par voie chimique sur l'héparine ou des esters d'héparine, donnant des résultats similaires, ou le procédé qui comprend :

- la mise en contact d'une fraction d'héparine avec de l'ATIII immobilisée sur un gel de Sépharose afin de fixer les constituants de la fraction d'héparine capables de se fixer à l'ATIII,

- la digestion des constituants de l'héparine ainsi fixés, par une héparinase, notamment d'origine bactérienne et,

- l'élution du gel des fragments à affinité par l'ATIII, le traitement de l'éluant renfermant lesdits fragments avantageusement selon les étapes décrites ci-dessus.

REVENDEICATIONS

1.- Fractions oligosaccharidiques, possédant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) du type de celles pouvant être obtenues par un procédé qui comprend les étapes de :

- 5 - mise en contact de l'héparine (ou des fractions hépariniques) possédant une activité anti-coagulante et comportant des chaînes d'un poids moléculaire d'environ 2000 à 50 000, avec un agent capable de dépolymériser ou fragmenter les chaînes hépariniques, les conditions utilisées pour réaliser cette
- 10 étape étant ajustées ^{de manière} à obtenir un mélange de dépolymérisation qui contient des fragments ou chaînes oligosaccharidiques constitués par huit motifs au plus, possédant cependant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) et comportant une séquence constituée
- 15 par moins de huit motifs, cette séquence étant responsable, dans une large mesure, de l'activité spécifique anti-Xa des produits ;
- le traitement du mélange de dépolymérisation afin de séparer au moins la majeure partie des chaînes
- 20 oligosaccharidiques définies ci-dessus, ce traitement comprenant avantageusement
 - a) le contact du mélange de dépolymérisation avec de l'ATIII pour adsorber ou retenir au moins la majeure partie, avantageusement pratiquement la totalité des oligosaccharides possédant une séquence
 - 25 ayant une structure spécifique vis à vis de l'ATIII,
 - b) l'élimination des produits non désirés,
 - c) la récupération des produits désirés ; et les sels pharmaceutiquement acceptables de ces fractions.
- 30

2. - Fractions oligosaccharidiques selon la revendication 1, caractérisées par le fait que _____ les produits possédant une affinité pour l'ATIII et une activité anti-Xa, tels que récupérés à partir du procédé mentionné ci-dessus, sont soumis à une ou plusieurs

35 étapes afin de séparer les oligosaccharides actifs à chaînes courtes définis ci-dessus, et avantageusement sont fractionnés par exemple par gel perméation selon

leur poids moléculaire et/ou leur densité ionique, les fractions désirées étant ensuite récupérées.

3.- Fractions oligosaccharidiques selon la revendication 1, caractérisées par le fait que dans ledit procédé le mélange de dépolymérisation est fractionné avant d'être mis en contact avec l'ATIII.

4. - Fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées par le fait que dans ledit procédé le matériau héparinique est dépolymérisé par voie chimique, en particulier avec de l'acide nitreux, HNO_2 , en milieux aqueux, ce qui entraîne la formation de chaînes saccharidiques courtes contenant à leur extrémité réductrice un groupe 2,5-anhydromannose, ou par voie enzymatique avantageusement avec une héparinase hautement purifiée, plus spécialement une héparinase d'origine bactérienne, ce qui entraîne la formation de chaînes saccharidiques courtes terminées à leur extrémité non réductrice par un acide uronique α - β insaturé.

5. - Oligosaccharides tels que ceux obtenus dans les fractions selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, ou leurs sels pharmaceutiquement acceptables, caractérisés par le fait qu'ils possèdent une affinité pour l'ATIII, une activité anti-Xa supérieure à celle de l'héparine et une activité anti-coagulante globale très faible, qu'ils ne sont pas constitués par plus de huit motifs saccharidiques et qu'ils comportent une séquence qui ne possède pas plus de huit motifs saccharidique et est responsable, dans une large mesure, de leur activité spécifique anti-Xa, cette séquence possédant une structure spécifique nécessaire pour reconnaître l'ATIII et se lier à l'ATIII.

6.- Fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, et oligosaccharides selon la revendication 5, caractérisés par le fait qu'ils possèdent un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont dans un rapport d'au moins 30, de préférence d'au moins 100.

7. - Fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 5 et 6 et oligosaccharides selon la revendication 5 ou 6 caractérisés par le fait qu'ils possèdent une activité anti-Xa dix fois supérieure à celle de l'héparine, qui peut être supérieure à 100 ui/mg, avantageusement supérieure à 700 ou même à 1000 ou 1200 et peut atteindre 2000 ui/mg ou plus.
8. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un résidu N-sulfate-D-glucosamine avantageusement 3-O sulfaté (F).
9. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un résidu N-acétyl-D-glucosamine (D) et/ou un résidu acide D-glucuronique (E) et/ou un résidu d'acide 2-O-sulfate-L-iduronique (G) et/ou un résidu N-sulfate-D-glucosamine (H).
- 10.- Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un motif acide 2-O-sulfate, 4,5-insaturé uronique (A) et/ou un motif N-sulfate D-glucosamine (B) et/ou un motif acide L-iduronique (C).
11. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisés par le fait qu'ils contiennent un résidu N-sulfate-D-glucosamine à leur extrémité réductrice, ce résidu étant sulfaté ou non en positions 3 et/ou 6.
12. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, contenant tous les résidus définis ci-dessus, caractérisés par la présence d'environ une molécule ^{de} N-acétyl-glucosamine par chaîne oligosaccharidique et/ou un motif N-acétyl-D-glucosamine pour deux ou trois motifs N-sulfate-glucosamine.

13. - Oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 12, caractérisés par les structures suivantes ABCDEFGH, ABGHCDEF, ABCDEF, CDEFGH (dans laquelle C est un acide uronique insaturé ou un résidu d'acide iduronique) DEFGH.
14. - Fractions oligosaccharidiques caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'oligosaccharides à chaînes courtes, pouvant être obtenues par le procédé défini dans la revendication 1, dans lequel lesdites conditions de dépolymérisation sont ajustées de manière à conserver le pouvoir d'au moins une partie des oligosaccharides résultants d'être retenus spécifiquement sur de l'ATIII immobilisée.
15. - Fractions oligosaccharidiques constituées par lesdits oligosaccharides à chaînes courtes, pouvant être obtenues par le procédé défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lequel lesdites conditions de dépolymérisation sont ajustées afin d'obtenir des oligosaccharides dont au moins une partie possède encore une activité anti-Xa telle que mesurable par le test Yin-Wessler, mais ne possède plus d'activité anti-coagulante selon le test USP.
16. - La partie des fractions selon la revendication 1, pouvant être séparée par gel filtration, constituée par les oligosaccharides à chaînes courtes, possédant une activité anti-coagulante dans le test Yin-Wessler mais ne possédant plus d'activité dans le test USP.
17. - Les fractions finales selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées par le fait qu'elles peuvent être séparées par gel filtration à partir de toutes les espèces moléculaires qui peuvent être retenues par l'ATIII puis éluées de l'ATIII.
18. - Procédé d'obtention de fractions oligosaccharidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6, 7 ou 14 à 18 ou des oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 5 à 13 comprenant les étapes de :
- mise en contact de l'héparine (ou de fractions hépariniques) possédant une activité anti-coagulante et com-

- portant des chaînes avec des poids moléculaires d'environ 2000 à environ 50 000, avec un agent capable de dépolymériser ou de fragmenter les chaînes hépariniques, les conditions utilisées pour réaliser cette étape
- 5 étant ajustées afin d'obtenir un mélange de dépolymérisation qui contient des fragments ou des chaînes oligosaccharidiques constituées par huit motifs au plus, possédant cependant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) et comprenant une séquence constituée par moins de huit
- 10 motifs, cette séquence étant responsable, dans une large mesure, de l'activité spécifique anti-Xa des produits;
- le traitement du mélange de dépolymérisation afin de séparer au moins la majeure partie des chaînes oligosaccharidiques définies ci-dessus, ce traitement comprenant avantagement a) le contact du mélange de
- 15 dépolymérisation avec de l'ATIII pour adsorber ou retenir au moins la majeure partie, avantagement pratiquement la totalité des oligosaccharides possédant une séquence ayant une structure spécifique vis à vis de l'ATIII, b) l'élimination des produits non désirés, c) la récupération des produits désirés.
- 20
19. - Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'héparine est dépolymérisée par voie chimique, avantagement avec HNO_2 en milieu aqueux à un pH
- 25 de l'ordre de 2 à 4, de préférence 3, et à une température proche de l'ambiante, ou par voie enzymatique avec une héparinase hautement purifiée d'origine bactérienne, plus spécialement provenant de flavobacterium
- 30 heparinium, à un pH de 6 à 8, en particulier voisin de la neutralité et à une température proche de l'ambiante.
20. - Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que l'on réalise la séparation de la majeure partie des produits contenus dans le mélange de
- 35 dépolymérisation ayant une activité élevée anti-Xa par chromatographie d'affinité sur une colonne contenant de l'ATIII immobilisée, cette colonne étant avantagement équilibrée avec un tampon ayant une force ionique d'environ 0,2 M, de préférence supérieure ou
- 40

égale à 0,1 M, à un pH de 6 à 8, de préférence voisin ou légèrement supérieur à la neutralité, les produits dépourvus d'affinité pour l'ATIII ou n'ayant qu'une faible

activité pour l'ATIII étant éliminés par lavage avec
5 un tampon avantageusement du même type que celui utilisé pour équilibrer la colonne.

21. - Procédé selon l'une quelconque des revendications
18 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend, pour récupérer
les produits retenus ou adsorbés sur l'ATIII ayant une
10 activité anti-Xa (Yin-Wessler), des étapes de désorption et de récupération de tous les oligosaccharides par élution avec un tampon ayant une force ionique suffisante à cet effet, le tampon utilisé pour cette élution étant
choisi parmi ceux qui n'interfèrent pas avec les étapes
15 suivantes de récupération (en particulier avec la précipitation alcoolique) des oligosaccharides contenus dans les fractions récupérées.

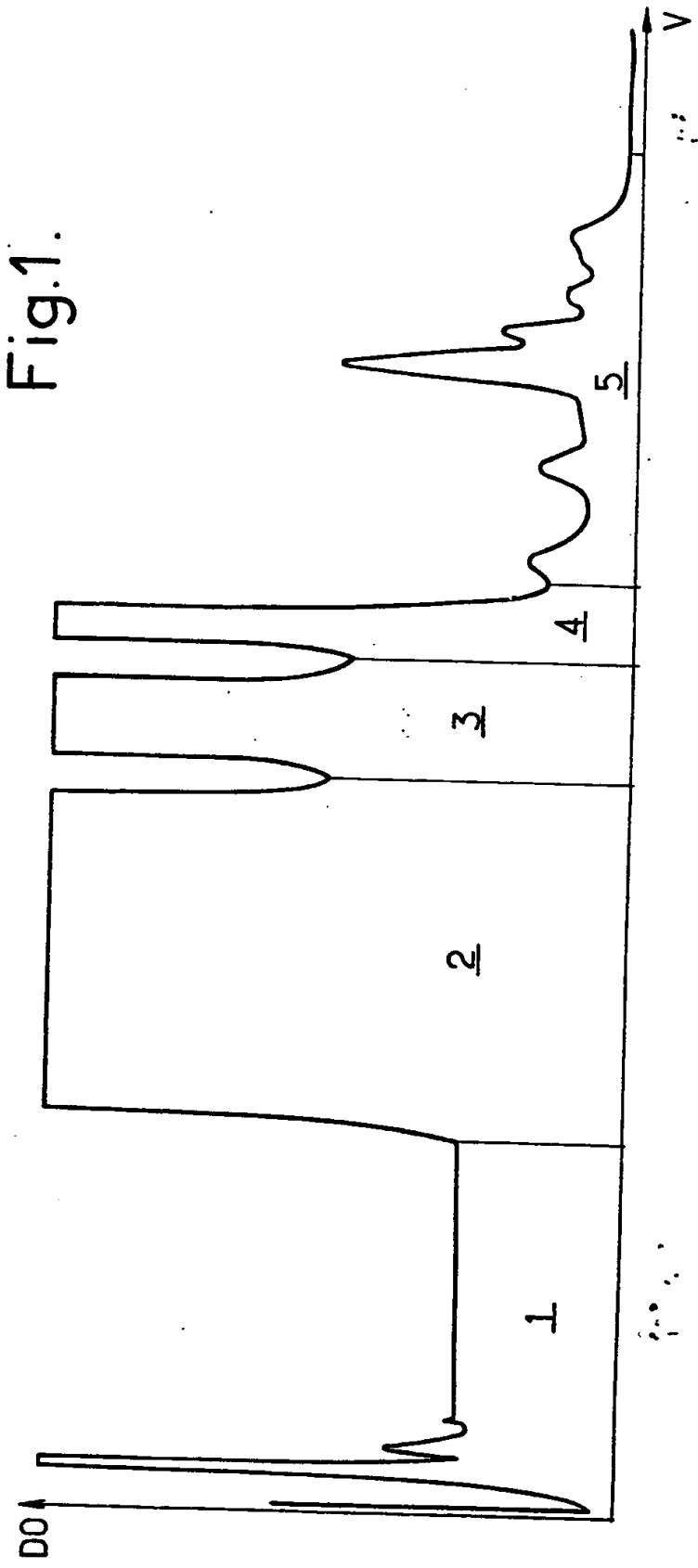
22. - Procédé selon l'une quelconque des revendications
18 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend le fractionne-
20 ment par exemple par gel perméation du mélange de tous les oligosaccharides précédemment retenus sur ATIII, ce fractionnement étant avantageusement conduit afin d'obtenir tout d'abord l'élution des plus grosses molécules, puis celle des plus petites molécules, en partant
25 des fractions qui possèdent un titre Yin-Wessler et un titre USP qui sont dans un rapport d'au moins 30, de préférence 100, la récupération s'étendant à toutes les fractions restantes qui possèdent encore une activité anti-Xa au moins dans le test Yin-Wessler.

30 23. - Procédé selon l'une quelconque des revendications 18 à 23 caractérisé en ce qu'avant l'étape de fixation sur ATIII, on élimine du mélange de dépolymérisation les oligosaccharides possédant plus de huit motifs saccharidiques, avantageusement par gel filtration, ou un
35 procédé semblable.

24. - Composition pharmaceutique contenant une quantité efficace d'au moins un oligosaccharide selon l'une quelconque des revendications 5 à 13, ou d'une fraction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, 6, 7 et 14 à
40 17 en association avec un véhicule pharmaceutique.

- 25.- Composition selon la revendication 24, se présentant sous une forme d'administration, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une solution concentrée stérile injectable d'oligosaccharides, utilisable en thérapeutique pour le contrôle de certaines étapes de la coagulation sanguine, cette solution contenant de 1.000 à 100.000 ui/ml (Yin-Wessler) d'oligosaccharides, de préférence de 5.000 à 50.000, par exemple de 25.000 ui/ml, lorsqu'elle est destinée à l'injection par voie sous-cutanée, ou contenant encore par exemple de 500 à 10.000, par exemple de 5.000 ui/ml d'oligosaccharides, lorsqu'elle est destinée à l'administration par voie intraveineuse ou par perfusion.

Fig.1.



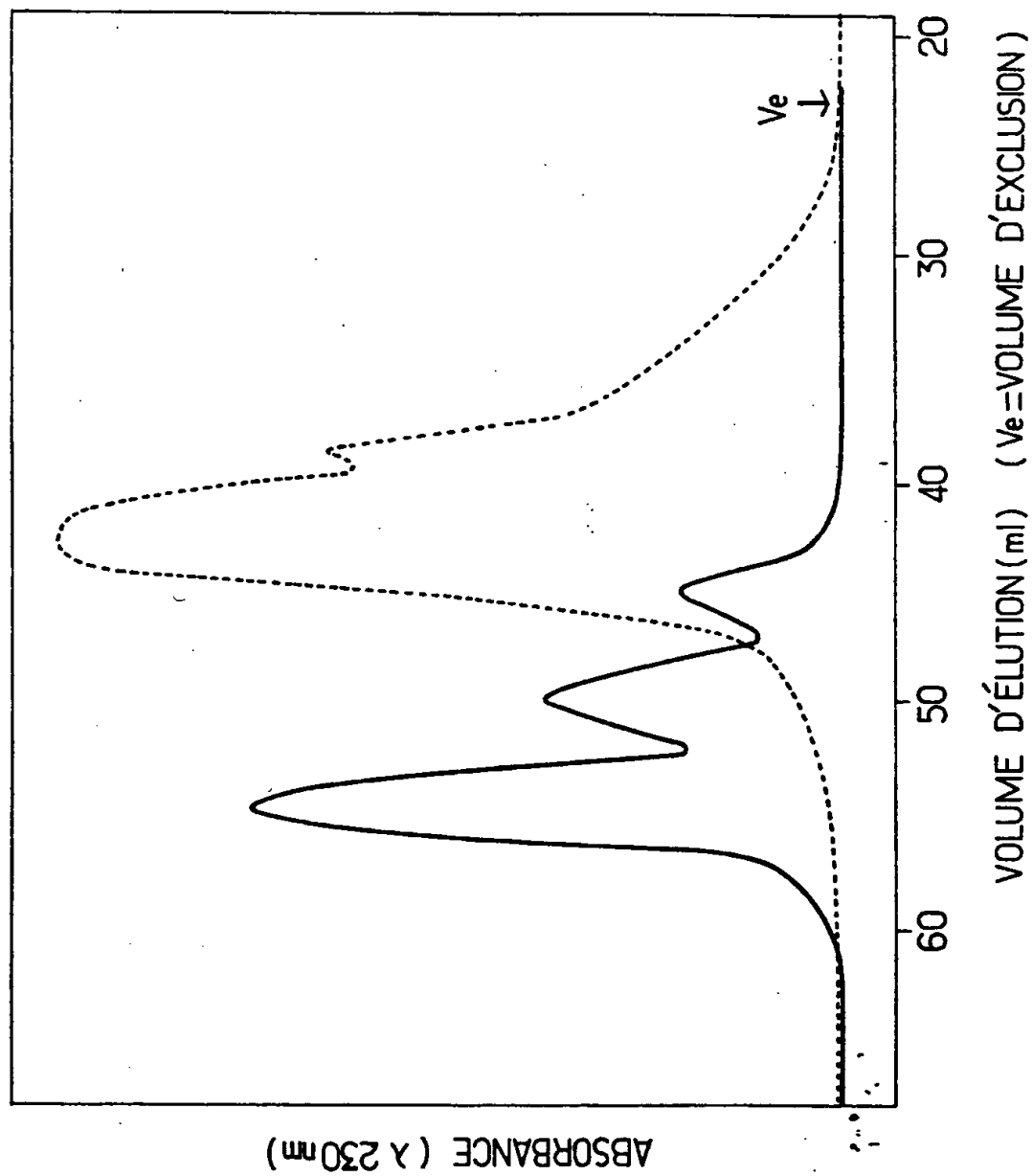
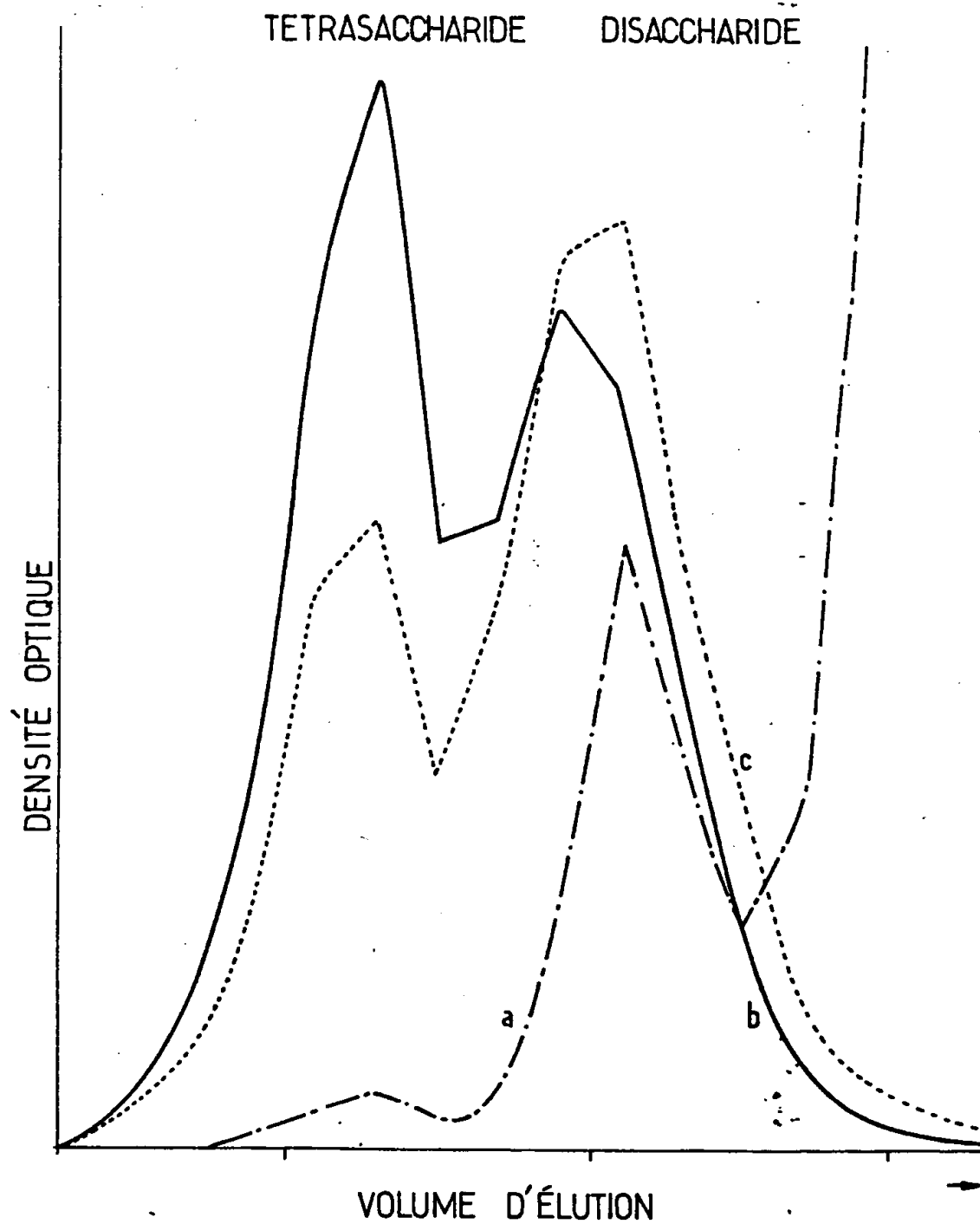


Fig.3.



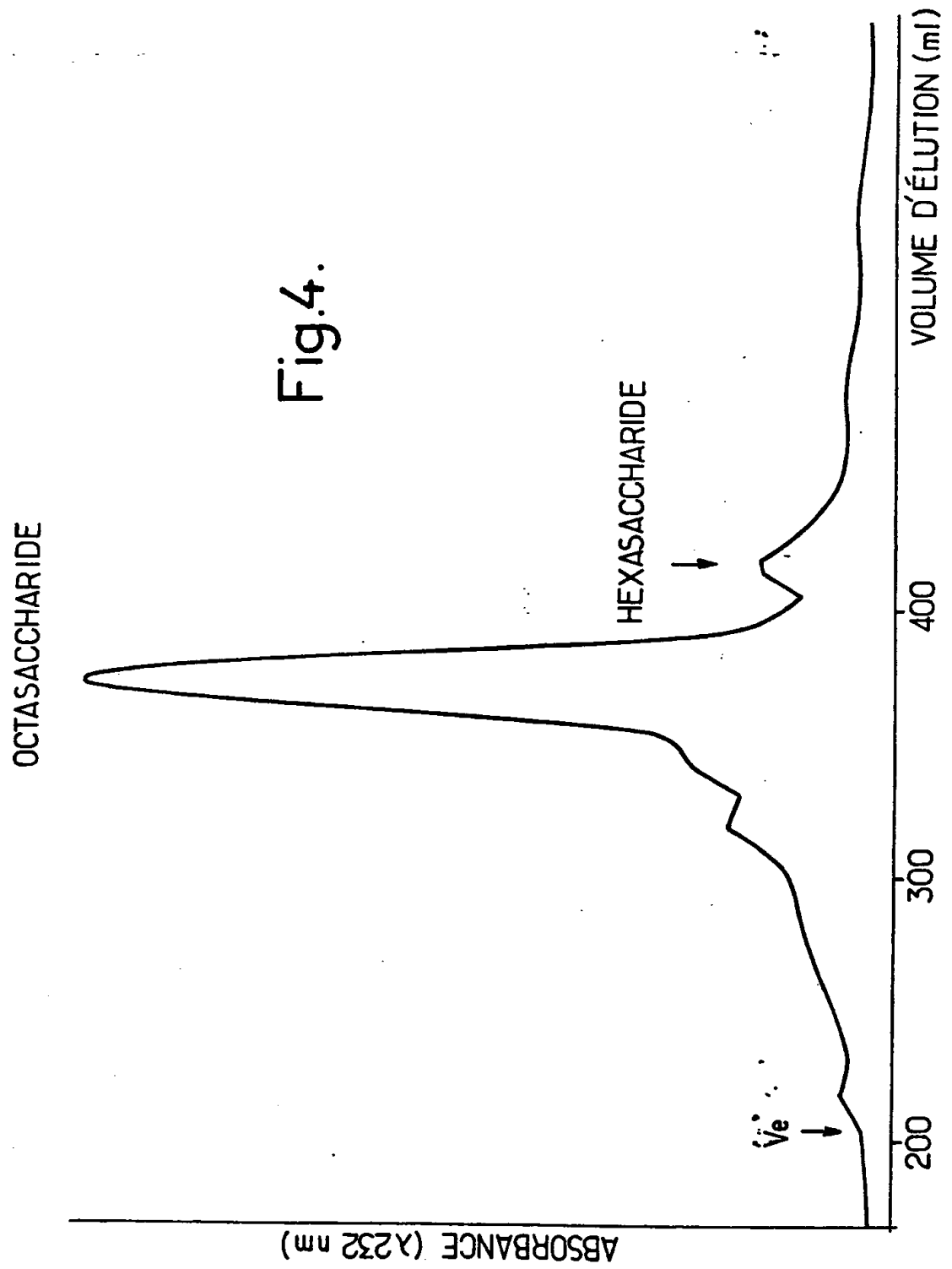
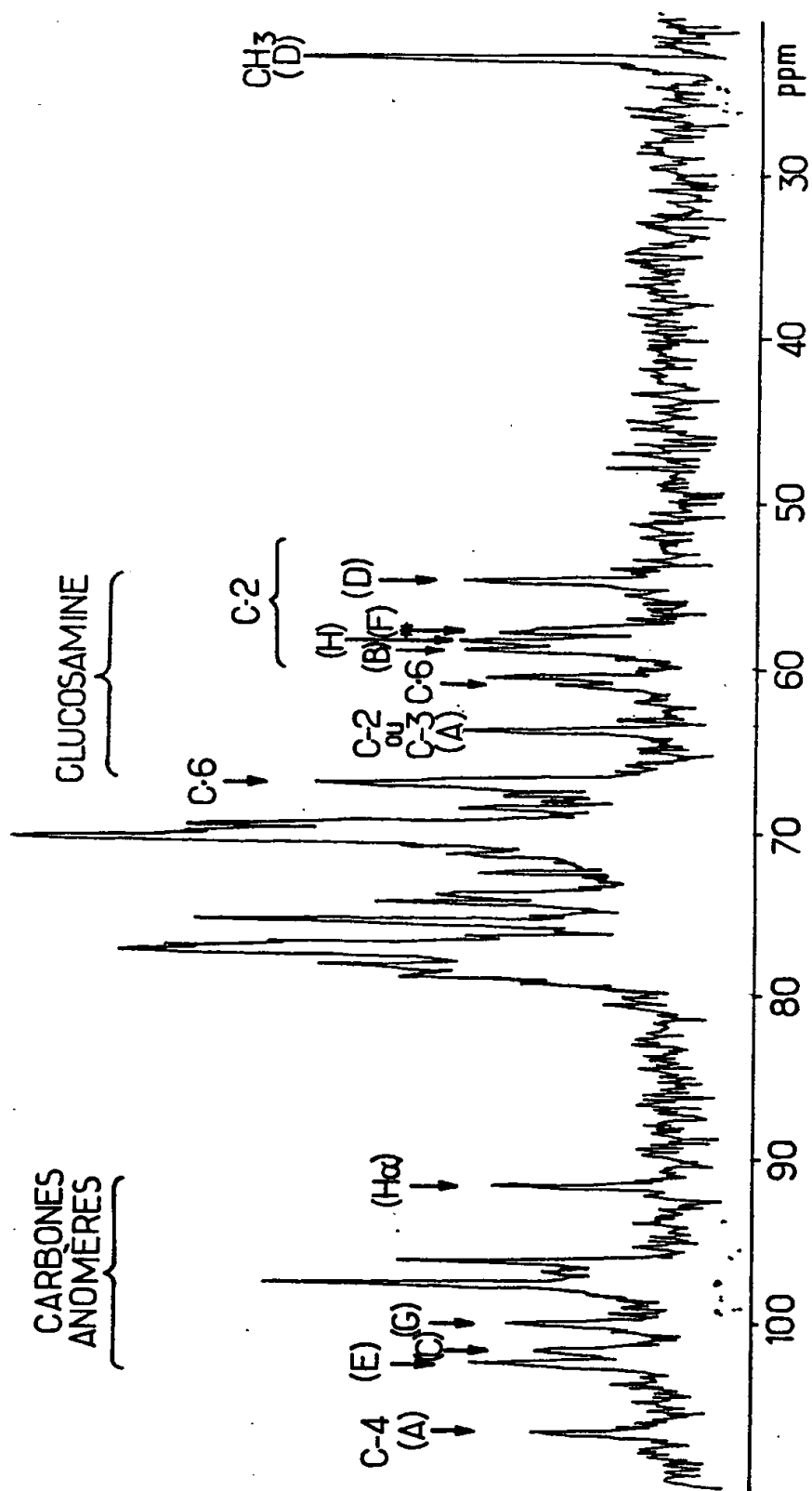


Fig.5.



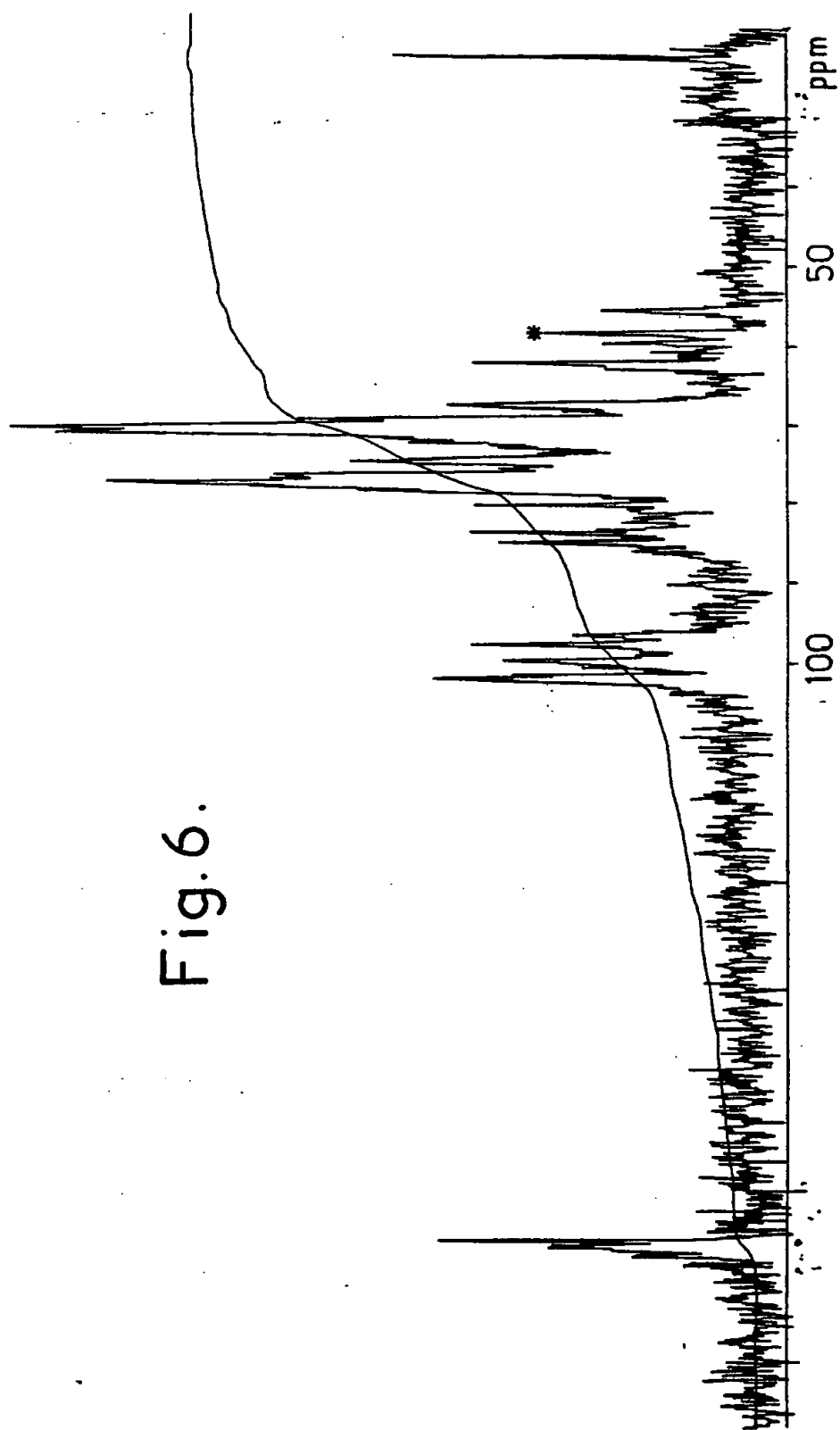


Fig. 6.



Office européen
des brevets

RAPP RT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0027089

Numéro de la demande

EP 80 40 1425

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 85, no. 13, 27-09-1976, abrégé 89445z, page 239 Columbus, Ohio, US J.A. CIFONELLI: "Nitrous acid depolymerization of glycosaminoglycans" & Methods Carbohydr. Chem. 1976, 7, 139-41 * Abrégé en entier *</p> <p>--</p>	1-22	C 08 B 37/10 A 61 K 31/725
	<p>US - A - 3 766 167 (S.E. LASKER et al.) * Exemple 3, revendication *</p> <p>--</p>	1-25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)
	<p>GB - A - 2 002 406 (HEPAR) * Revendications *</p> <p>--</p>	1-25	C 08 B 37/10 A 61 K 31/725
	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 85, no. 17, 25-10-1976, abrégé 118382j, page 190 Columbus, Ohio, US J.E. SHIVELY et al.: "Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin" & Biochemistry, 1976, 15(18), 3932-42 * Abrégé en entier *</p> <p>--</p>	1-22	CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES
	<p>GB - A - 2 001 528 (YOSHIHARU MIURA) * Revendications *</p> <p>--</p>	1-25	<p>X: particulièrement pertinent A: arrière-plan technologique O: divulgation non-écrite P: document intercalaire T: théorie ou principe à la base de l'invention E: demande faisant interférence D: document cité dans la demande L: document cité pour d'autres raisons</p>
<p>Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications</p>			&: membre de la même famille, document correspondant
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examineur	
La Haye	14-01-1981	LENSSEN	



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0027089

Numéro de la demande

EP 80 40 1425

-2-

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
P	<p><u>GB - A - 2 035 349 (CHOAY)</u> * Document en entier * & DE - A - 2 944 792</p> <p>--</p> <p><u>US - A - 4 119 774 (LARS-OLOV AN- DERSSON)</u> * Abrégé et revendications *</p> <p>----</p>	<p>1-25</p> <p>1-25</p>	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)</p>